Vol. 2 DEZEMBRO - 1959 N.os 1 e 2

REVISTA

DO

INSTITUTO DE ANTIBIÓTICOS

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA
UNIVERSIDADE DO RECIFE
INSTITUTO DE ANTIBIÓTICOS

INSP
PAT
MIC

Rev. Inst. Antib. Univ. Recife

PERNAMBUCO — BRASIL

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL
18 JUL 196

Instituto de Antibióticos da Universidade do Recife

FUNDADO EM 8 MARÇO DE 1952

Reitor da Universidade do Recife

PROF. DR. JOÃO ALFREDO GONÇALVES DA COSTA LIMA

Diretor do Instituto de Antibióticos

PROF. DR. OSWALDO GONÇALVES DE LIMA

SECÇÃO DE ANTIBIÓTICOS DE ACTINOMICETOS

Marisa Machado Fernandes de Albuquerque
Francisco Décio de Andrade Lira
Gessé Medeiros Maciel
Karline de Valésio Pinto

SECÇÃO DE BIOLOGIA E CÂNCER EXPERIMENTAL

Evans de Azevedo e Silva
Aristides de Paula Gomes
Lizete Lins de Oliveira

SECÇÃO DE MICROBIOLOGIA

José Otamar Falcão de Morais
Maria Helena Dália Maia

SECÇÃO DE ANTIBIÓTICOS DE PLANTAS SUPERIORES

Ivan Leôncio d'Albuquerque
José Sidney Barros Coelho
Maria Célia Pinto Navarro
Maria do Carmo Rocha Mesquita
Edna de Carvalho Marques

SECÇÃO DE BIOQUÍMICA

Bento Magalhães Neto
Myrthes da Silveira Nilo Bispo
Ed Paschoal Carrazzoni

SECÇÃO DE ANÁLISE ORGÂNICA

Erasto José da Costa
Gilberto Lôbo de Almeida
Júlio Vicente Alves de Araújo

Estagiários Acadêmicos

ESCOLA SUPERIOR DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE DO RECIFE
Aníbal Carnaúba Brandão, Armi Wanderley da Nóbrega, Hilbert Pires Henriques, Orlando Franco Muniz da Rocha, Sebastião Callou e Wilneide Mabel Malaquias Queiroz.

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO RECIFE
Clécio Ferreira de Santana, Gileno Fernandes Xavier, Guido Rabelo Machado, José Darwin Dias Sanchez e Silas de Carvalho.

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICINA
Isis Bezerra Sobral.

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
Beatriz Lucena

Comissão de Redação

Oswaldo Gonçalves de Lima
Bento Magalhães Neto
José Otamar Falcão de Morais
Maria Helena Dália Maia

ENDERÊÇO : Cidade Universitária
Engenho do Meio
Recife — Brasil

Vol. 2 DEZEMBRO - 1959 N.os 1 e 2

REVISTA

DO

INSTITUTO DE ANTIBIÓTICOS

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA
UNIVERSIDADE DO RECIFE
INSTITUTO DE ANTIBIÓTICOS

Rev. Inst. Antib. Univ. Recife

PERNAMBUCO — BRASIL

Recife. Universidade. *Instituto de Antibióticos.*
Revista do Instituto de Antibióticos. v. 1 —
jan. 1958 — Recife, 1958 —
v. ilust. 23 cm. semestral.

1. Antibióticos — Periódicos. I. Título.

615.32905 (C. D. 16. ed.)
615.779(05):061.6 (C. D. U.)

Univ. do Recife
S. C. B. 60-937

SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS DE PLANTAS SUPERIORES

Comunicação XIII — Notícia sôbre a atividade antibacteriana e antifúngica de alcalóides isolados de uma espécie de *Tabernaemontana* (*Apocynaceae*) vegetando na faixa costeira ao norte de Olinda (Pernambuco)

O. Gonçalves de Lima, Ivan Leôncio d'Albuquerque, Marisa M. Albuquerque, Evans Silva e Jacyrema A. Bandeira

O presente informe trata dos primeiros resultados obtidos com princípios antimicrobianos de natureza alcalóide existentes em um arbusto (*Tabernaemontana sp.; Apocynaceae*), vegetando na faixa costeira ao norte de Olinda (Pernambuco).

Um dos alcalóides — cromatogràficamente purificado — apresentou as reações de Hesse e Malowan para a ioimbina, embora dela se distinguisse pelo comportamento antimicrobiano.

Durante os nossos trabalhos de busca e caracterização de antibióticos de plantas superiores do Brasil, havemos constatado a existência de ação antibacteriana e antifúngica em extrato de raízes de um arbusto denominado vulgarmente "Jasmim-Flor" aparentemente espontâneo na faixa costeira ao norte de Olinda.

O material botânico (figs. 1 e 2) examinado pelo professor Dárdano de Andrade Lima, foi identificado como espécie do gênero *Tabernaemontana (Apocynaceae)*.

No decurso da pesquisa, foi isolado um alcalóide com ação contra germes Gram-positivos e ácido-resistentes. A existência de outro alcalóide com atividade contra espécies do gênero *Candida* também foi constatada.

Fig. 1

Fig. 2

ISOLAMENTO

No isolamento dos princípios ativos utilizámos dois métodos, que passamos a descrever:

1 — O extrato metanólico ácido da serragem de raízes da planta colhida nos meses de outubro a dezembro, neutralizado por solução de NaOH até pH 6,0 foi evaporado a sêco à pressão reduzida. O resíduo foi tomado por solução aquosa a 5% de ácido tartárico, desprezando-se o material insolúvel, sendo o filtrado tratado até esgotamento por éter etílico livre de peróxido, rejeitando-se o extrato etéreo inativo. A solução aquosa tartárica foi alcalinizada por solução de NaOH até pH 8,7, repetindo-se a extração com éter. À solução etérea — depois de convenientemente lavada com água pura — se adicionou, em funil de decantação, cêrca de um vigésimo do seu volume de água destilada e logo se acidulou gradativamente com solução de ácido clorídrico sob agitação, até o pH final de 4,0. A fase aquosa ativa foi liofilizada em aparelho de Pfeiffer Mod. LG, obtendo-se um resíduo de côr amarelada de potência de 7 a 10 mcg/ml contra *B. subtilis* 9 (Quadro I, coluna 1).

O material liofilizado foi submetido preliminarmente a uma prova de partição cromatográfica em papel (Whatman n.° 1), usando-se o sistema indicado por Munier (Block, 1958) para alcalóides, constituído de 10 ml de ácido acético glacial adicionados a 100 ml de n-butanol, sendo a mistura posteriormente saturada com água. O cromatograma foi revelado pelo reativo de Dragendorff (*ibid.*), observando-se duas manchas bem diferenciadas de Rf 0,48 e 0,73.

Diante dêste resultado, procedeu-se a uma partição Craig, usando-se como sistema n-butanol / tampão M fosfato a pH 5,4 empregando-se 40 elementos. Foi constatado que uma fração ativa, quase incolor, se distribuiu nos tubos 16-23 (Quadro I), enquanto uma outra, de côr amarela palha (clara) se concentrou entre os tubos 34 a 39, com atividade medíocre (Quadro II). Sem embargo, a atividade apresentada pela substância correspondente à fração mais ativa (tubos 16 a 23) foi próxima da que ofereceu o produto bruto liofilizado (Quadro I).

As duas substâncias A e B, separadas por partição e cromatografadas em papel, usando-se o sistema anterior

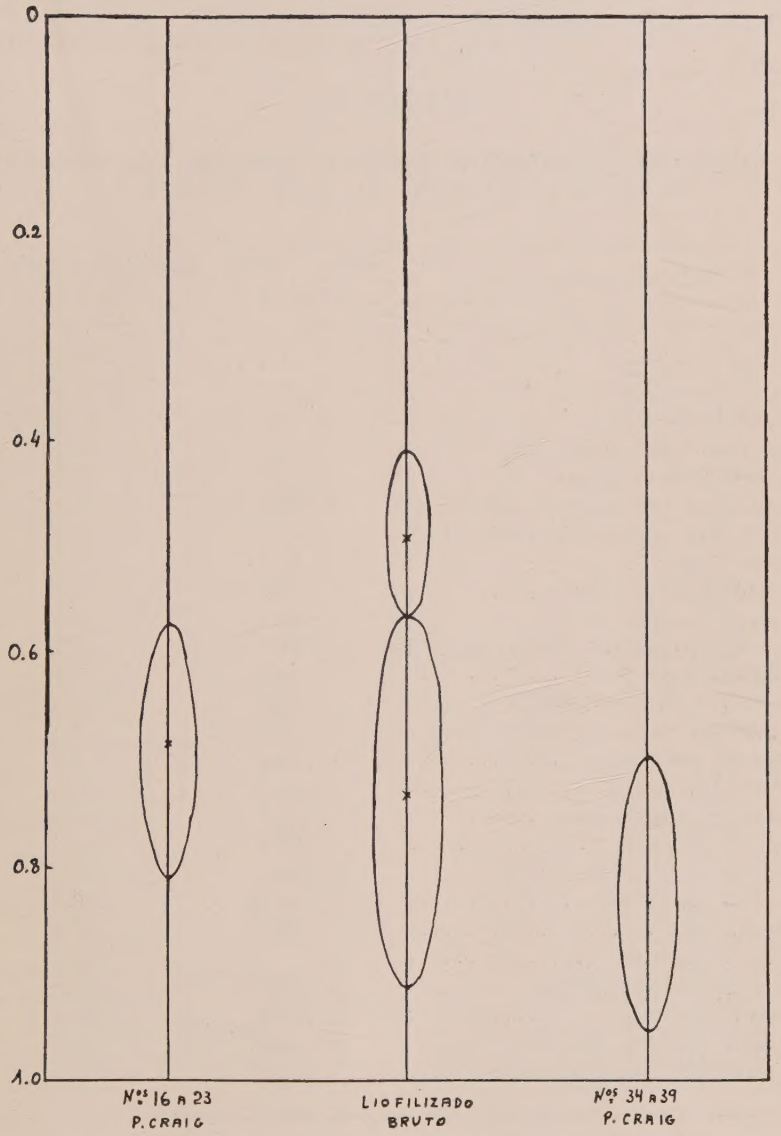

0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
Nos 16 a 23
P. CRAIG
LIOFILIZADO
BRUTO
Nos 34 a 39
P. CRAIG

Fig. 3

(prévia saturação do papel durante 12 h e desenvolvimento de 7 h), apresentaram respectivamente para o mesmo sis-

QUADRO I

Concentrações mínimas de inibição (mcg/ml) da substância bruta e da fração 16 a 23 (Partição)

Microorganismo	Subst. bruta mcg/ml	Fração A (16-23) mcg/ml
Bacillus subtilis 9	8,0	6,5
Bacillus anthracis	35,0	35,0
Bacillus mycoides	50,0	50,0
Staphylococcus aureus	35,0	50,0
Staphylococcus citreus	27,5	30,0
Diplococcus pneumoniae ATCC	22,5	22,5
Diplococcus pneumoniae 104		20,0
Sarcina lutea	16,0	17,5
Streptococcus pyogenes	90,0	40,0
Neisseria catarrhalis	22,5	30,0
Mycobacterium tuberculosis var. *hom.*	27,5	27,5
Mycobacterium phlei	14,0	17,5
Mycobacterium smegmatis	27,5	27,5
Corynebacterium diphteriae	14,0	10,0
Nocardia asteroides	14,0	15,0
Escherichia coli R.	> 100,0	> 100,0
Klebsiella pneumoniae	> 100,0	> 100,0
Shigella flexneri	> 100,0	> 100,0
Salmonella typhosa	> 100,0	> 100,0
Brucella melitensis	> 100,0	80,0
Brucella suis	90,0	90,0
Brucella abortus		70,0
Pseudomonas aeruginosa	> 100,0	> 100,0
Proteus vulgaris	> 100,0	> 100,0
Candida albicans IBB-50	> 100,0	> 100,0
Cryptococcus neoformans	> 100,0	> 100,0

tema usado anteriormente, valores Rf de 0,68 e 0,83, conforme se representa na figura 3, na qual também se exibe um resultado logrado com o produto bruto liofilizado, pa-

recendo-nos que tal variação de comportamento se deve a alterações das substâncias durante as operações de partição Craig e no desenvolvimento papirográfico.

QUADRO II

Concentrações mínimas de inibição (mcg/ml) da fração B (Partição: 34-39)

Microorganismo	mcg/ml
Bacillus subtilis 9	45,0
Bacillus anthracis	> 50,0
Bacillus mycoides	> 50,0
Staphylococcus aureus	> 50,0
Staphylococcus citreus	> 50,0
Diplococcus pneumoniae ATCC	70,0
Diplococcus pneumoniae 104	45,0
Sarcina lutea	45,0
Streptococcus pyogenes	> 100,0
Neisseria catarrhalis	50,0
Mycobacterium tuberculosis var. *hom.*	> 100,0
Mycobacterium phlei	> 100,0
Mycobacterium smegmatis	> 100,0
Corynebacterium diphteriae	45,0
Nocardia asteroides	> 100,0
Escherichia coli R.	> 100,0
Klebsiella pneumoniae	> 100,0
Shigella flexneri	> 100,0
Salmonella typhosa	> 100,0
Brucella melitensis	> 100,0
Brucella suis	> 100,0
Brucella abortus	> 100,0
Pseudomonas aeruginosa	> 100,0
Proteus vulgaris	> 100,0
Candida albicans IBB-50	> 100,0
Cryptococcus neoformans	> 100,0

QUADRO III

Concentrações mínimas de inibição (mcg/ml) da substância obtida pelo 2.° método

Microorganismo	mcg/ml
Bacillus subtilis 9	16,5
Bacillus anthracis	13,5
Bacillus mycoides	16,5
Staphylococcus aureus	16,5
Staphylococcus citreus	19,0
Diplococcus pneumoniae ATCC	13,5
Sarcina lutea	5,0
Streptococcus hemolyticus	22,5
Neisseria catarrhalis	9,0
Mycobacterium tuberculosis var. *hom.*	± 10,0
Mycobacterium phlei	± 10,0
Mycobacterium smegmatis	± 10,0
Corynebacterium diphteriae	± 4,0
Nocardia asteroides	± 15,0
Escherichia coli R.	> 100,0
Klebsiella pneumoniae	> 100,0
Shigella dispar	> 100,0
Salmonella typhosa	> 100,0
Brucella melitensis	19,0
Brucella suis	19,0
Brucella abortus	19,0
Pseudomonas aeruginosa	> 100,0
Proteus vulgaris	> 100,0
Candida albicans IBB-50	± 70,0
Candida albicans IHM	> 100,0
Candida tropicalis	± 90,0
Candida pseudotropicalis	> 100,0
Candida krusei	> 100,0
Candida para-krusei	> 100,0
Candida stellatoidea	45,0
Cryptococcus neoformans ENCB	> 100,0
Cryptococcus neoformans IHM	> 100,0

2 — O extrato metanólico evaporado a sêco, a vácuo, foi dissolvido no menor volume de metanol absoluto, rejeitando-se um resíduo pouco solúvel inativo e conservando-se o filtrado em refrigerador até completa eliminação de substâncias precipitáveis por arrefecimento.

A solução filtrada foi diluída com o mesmo solvente e acidificada com ClH até pH 2,0 e logo tratada por 6% de carvão ativo (Merck). O filtrado diluído com água e esgotado com éter etílico foi alcalinizado com NaOH a 10% até pH 9,5, e novamente tratado por éter. O resíduo dêste extrato etéreo, apresentando atividade de 19 mcg/ml para *B. subtilis* e 80 mcg/ml para *Candida albicans*, foi dissolvido em metanol e extraído por éter de petróleo. O resíduo da evaporação do extrato ligroínico foi dissolvido em éter etílico, juntando-se-lhe um pouco de água e acidificando-se gradativamente por ácido clorídrico até atingir pH 6,0. A solução aquosa obtida foi liofilizada, oferecendo um resíduo de côr creme, não higroscópico, com atividade de 17 mcg/ml para *B. subtilis* e 80 mcg/ml para *C. albicans* (Quadro III).

Êste material foi submetido a cromatografia em papel usando-se, em conseqüência dos Rf apresentados anteriormente, o sistema indicado por Munier e Macheboeuf (*apud* Romeike, 1955) para os alcalóides do grupo ioimbina-corinanteína, constituído de 100 partes em volume, de n-butanol e 4 partes em volume de ácido clorídrico (d = 1,179) e saturando-se a mistura, gôta a gôta, com água. Por desenvolvimento ascendente, durante 5 h, em papel Whatman n.° 1, depois de prévio tratamento dêste com o solvente atrás indicado, obteve-se u'a mancha alcalóide-positiva (Reativo de Dragendorff) e ativa contra *B. subtilis*, com Rf = 0,81. Operando-se em paralelo com amostras puras de cloridrato de ioimbina, observou-se u'a mancha com Rf 0,77 inativa (fig. 4).

Utilizando-se o mesmo sistema, em cromatografia preparativa em papel, logramos eluir da faixa ativa uma substância idêntica ao material anteriormente provado, a qual apresentou na reação de Hesse (1882) comportamento idêntico à ioimbina. Da mesma maneira, a reação de Malowan (1950) para ioimbina com p-dimetilaminobenzaldeído e ni-

Cromatograma de diferentes amostras purificadas do alcalóide do "Jasmim Flor" em comparação com a ioimbina. Sistema usado: n-butanol: ácido clorídrico (D = 1,179) — 100:4 v/v, sat. c/água, gôta a gôta. JF_1, JF_2 JF_3 e JF_4 = amostras do cloridrato do alcalóide do "Jasmim Flor". 10 = clorid. de ioimbina

Fig. 4

trato de sódio em meio clorídrico foi positiva para a substância cromatogràficamente pura.

A atividade desta amostra purificada conservou-se igual à do produto bruto (Quadro III) para *Candida albicans* IBB-50 (70 mcg/ml), enquanto que foi inferior para *B. subtilis* 9 (55 mcg/ml).

PROPRIEDADES

Tanto as frações A e B, como o produto obtido pelo segundo método (inclusive o purificado por cromatografia) se comportaram como alcalóides perante os reativos gerais dêste grupo (Quadro IV) notando-se algumas diferenças entre si, principalmente perante os reativos de Marquis, de Schaer e ácido tânico.

Diante do seu comportamento papirográfico, pareceu-nos tratar-se de substância do grupo da ioimbina, o que é reforçado pela positividade das reações de Hesse e Malowan.

Uma substância cromatogràficamente pura em forma de cloridrato (obtido pelo segundo método) — provàvelmente um derivado do composto original lábil — apresentou na determinação de pf sinais de decomposição em derredor de 196° C (Gallenkamp), valor bem diferente do apresentado pela ioimbina (cloridrato) com pf de 302° C. Uma única análise do mesmo produto (cloridrato) apresentou os seguintes valores: C = 59,99; H = 7,14; Cl = 9,36; O= 17,01.

DISCUSSÃO

O cotejo dos valores oferecidos pelos espectros antimicrobianos constantes dos quadros I e III, põe em manifesto que há pelo menos duas substâncias ativas com comportamento de alcalóides, nos liofilizados obtidos pelos dois métodos atrás referidos. A fração A (16-23) da partição Craig, pelo primeiro método, embora a atividade contra *B. subtilis* 9 fôsse de 6,5 mcg/ml, não guarda no entanto, em comparação com o liofilizado do 2.° método (Quadro III) (com 16,6 mcg/ml contra *B. subtilis* 9) a correspondência esperada em relação a determinados germes, especialmente espécies de *Mycobacterium* e *Brucella*. Ademais, as duas substâncias A e B, obtidas pelo primeiro método, as quais tão nìtidamente se distinguem por suas migrações na partição Craig e em papel, apresentaram-se bem diferentes em suas ações antimicrobianas, parecendo-nos, no entanto, que a segunda é um derivado da primeira, provàvelmente por oxidação durante as operações de partição.

QUADRO IV

Reações de Alcalóides das Substâncias Bruta e Purificada

Reativo	Substância bruta (1.º método)	Fração correspondente aos tubos 16 a 23	Fração correspondente aos tubos 34 a 39	Substância bruta 2.º método
Mayer	precipitado branco	precipitado branco-amarelado	precipitado creme-claro	precipitado branco-amarelado
Wagner	precipitado tijolo	precipitado tijolo	precipitado tijolo	precipitado vermelho-tijolo
Dragendorff	precipitado vermelho	precipitado vermelho	precipitado vermelho	precipitado vermelho-tijolo
Scheibler	precipitado branco	precipitado branco	precipitado branco	precipitado branco-azulado
Ácido Sílico-túngstico	precipitado branco-amarelado	precipitado branco-cinza	precipitado creme-claro	precipitado branco-cinza
Hager	precipitado amarelo	precipitado amarelo	precipitado amarelo	precipitado amarelo
Ácido tânico	turvação	fraca turvação	precipitado	turvação muito tênue
Erdmann	coloração amarela	coloração amarela-clara	coloração amarela	coloração amarelo verde de limão
Marquis	coloração verde	coloração rósea	coloração verde	coloração conhaque
Schaer	coloração conhaque	coloração laranja	coloração conhaque	coloração inicial verde passando a pardo esverdeado

NOTA : A substância bruta foi testada em solução aquosa, sob forma de cloridrato (pH 5,0), enquanto as duas frações, em solução de metanol-água, acidulada por ClH.

TOXIDEZ

As provas de toxidez dos liofilizados (substâncias obtidas pelo primeiro e pelo segundo métodos) foram realizadas em camundongos suíços albinos, utilizando-se solução aquosa (pH 5,7) por via cutânea.

A substância liofilizada pelo primeiro método não se demonstrou tóxica nas doses utilizadas, durante 7 dias de observação (Quadro V). A substância liofilizada pelo segundo método demonstrou-se tóxica nas doses de 750 mg/kg, e sem toxidez apreciável na dose de 500 mg/kg (quadro VI).

O cloridrato de ioimbina apresentou DL_{100} a 150 mg/kg (Quadro VII).

QUADRO V

Toxidez em camundongos
(liofilizado obtido pelo 1.° método)

Dose única (mg/kg)	Via	N.° Total animais	Sobreviventes/Mortos
50	Subcutânea	5	5 / 0
200	"	5	5 / 0
500	"	5	5 / 0
800	"	5	5 / 0

QUADRO VI

Toxidez em camundongos
(liofilizado obtido pelo 2.° método)

Dose única (mg/kg)	Via	N.° Total animais	Sobreviventes/Mortos
100	Subcutânea	5	5 / 0
250	"	5	5 / 0
500	"	5	5 / 0
750	"	5	3 / 2
1000	"	5	0 / 5

QUADRO VII

Toxidez em camundongos
(cloridrato de ioimbina)

Dose única (mg/kg)	Via	N.º Total animais	Sobreviventes/Mortos
100	Subcutânea	5	4 / 1
150	"	5	0 / 5

SUMMARY

This article deals with the first results obtained with antibiotical substances of alkaloid nature existing in a bush (*Tabernaemontana sp*; *Apocynaceae*) growing in the coastal land of north Olinda (Pernambuco).

One of the alkaloids — purified by chromatography — has presented the reactions of Hesse and of Malowan for yohimbine, but it can be distinguished from the later by its antimicrobial behaviour.

The methods used for the isolation of the substances and the dates on both antibiotical activities and toxicity are presented.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Mitteilung befasst sich mit ersten Ergebnissen welche mit den antibiotischen Stoffen alkaloider Natur des Strauches (*Tabernaemontana sp*; *Apocynaceae*) erhalten wurden; gennanter Strauch gedeiht an der Kuestengegend im Norden von Olinda (Pernambuco).

Eines der chromatographisch gereinigten Alkaloide zeigt die Reaktionen von Hesse, desgleichen die von Malowan, beide fuer Yohimbim, doch besteht trotzdem ein Unterschied hinsichtlich des antibakteriellen Verhaltens.

Es werden die bei der Isolierung des Hemmstoffes angewandten Methoden vorgelegt, desgleichen die Angaben ueber die antibiotische Wirksamkeit und Toxitaetspruefungen.

RESUMÉ

Les auteurs présentent les prémiers résultats obtenus avec des principes antimicrobiens alcaloïdiques provenant d'un arbuste (*Tabernaemontana sp., Apocynaceae*) des côtes maritimes au Nord de Olinda, Pernambuco.

L'un des alcaloides, purifié par chromatographie, donne les reactions de Hesse et Malowan pour l'yohimbine, mais il présente un comportement antimicrobien tout à fait different.

REFERÊNCIAS

BLOCK, R. J., E. L. DURRUM & ZWEIG ,G. *A Manual of Paper Chroma-*
BLOCK *et al., op. cit.*, 361.

MUNIER, R., M. MACHEBOEUF, *Bull. Soc. Chim. biol 33*, 846-356 (1951), *apud* K. ROMEIKE, Alkaloids *in Papierchromat. in der Botanik.* Springer-Verl. 236 (1955).

HESSE, A., *Chem. Z. 211* (1882) *in Beilstein's Handbuch der Organischen Chemie*, 4 Aufl. Bd. *25*, 204.

MALOWAN, L. S. *Analyst. 75*, 338 (1950).

SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS DE PLANTAS SUPERIORES

Comunicação XIV. OCORRÊNCIA DE ANTIBIÓTICOS EM MADEIRAS-DE-LEI DO BRASIL

O. Gonçalves de Lima, Marisa Machado de Albuquerque e Maria Helena Dália Maia

São apresentados os resultados de uma pesquisa de antimicrobianos em espécimes de madeiras-de-lei nacionais, procedentes em sua maioria, da região de Itabuna na Bahia, constatando-se em quase tôdas apreciável atividade, algumas com ação relevante contra basidiomicetos comuns nas florestas úmidas dêste Estado, de uma coleção que nos foi oferecida pelo professor Dr. Carroll William Dodge e Dra. Bertha Sanford Dodge.

E' utilizada no presente trabalho u'a modificação ao "cromatograma sumário" de Ishida & Miyazaki (1952) e à contribuição de Sevcík (1959), proposta por um de nós (Gonçalves de Lima, 1959), como um método mais adequado à observação, prévia ao isolamento, da conduta papirográfica de cada substância ativa de planta superior, perante solventes puros ou sistemas de partição, de precipitação, de ação "salting out" e de determinados reativos.

A ocorrência de substâncias antibióticas desempenhando um papel na resistência oferecida aos agentes microbianos de deterioração pelas madeiras chamadas vulgarmente "madeiras-de-chão" ou "madeiras-de-lei" do país, foi uma possibilidade aventada por um de nós (Gonçalves de Lima), como uma simples hipótese a considerar. A êste respeito, é de notar os resultados de pesquisadores europeus sôbre os antibióticos pinossilvina e tuiaplicina de cernes de madeiras como o *Pinus silvestris* e *Thuja plicata* (Erdtman, 1939, 1948), sendo o primeiro ativo contra fungos destruidores de lenho, o mesmo ocorrendo em relação a beta-tuiaplicina.

A importância que substâncias antibióticas de proteção contra fungos nocivos às madeiras poderiam possuir foi bem apreciada por Vogel (1951) ao escrever: "Talvez ainda alcance grande significação técnica, o fato de existir no cerne de madeira de muitas árvores — embora não em tôdas — substâncias protetoras contra fungos destrutores e, seguramente, pesquisas cuidadosas neste sentido, ainda fornecerão resultados bastante úteis. Pode mesmo ser encontrado, em determinadas circunstâncias, um método todo novo de conservação da madeira. Êste campo tem sido muito pouco pesquisado. Seria de desejar que os bioquímicos se ocupassem mais com as substâncias naturais de defesa natural da madeira. As pesquisas no campo de antibióticos podem trazer excelentes resultados, também num campo que nada tem de comum, como o da quimioterapia das doenças humanas ou animais*".

Os resultados logrados com algumas espécies por nós estudadas inicialmente vieram demonstrar que uma exploração em tal campo podia ser de proveito, a julgar pelo que verificámos no "pau-d'arco roxo" (*Tabebuia sp.*), no qual foram constatados dois antibióticos, o lapachol e a xiloidina, cujo estudo tivemos oportunidade de oferecer. (Gonçalves de Lima, Ivan d'Albuquerque e M. Machado, 1956, 1956a).

Recentemente, tivemos ocasião de voltar ao assunto ao ser-nos oferecida pelo Engenheiro Dr. Antônio Mutti de Carvalho, Diretor da D.E.R., Setor Sul da Bahia, uma preciosa coleção de espécimes de madeira-de-lei da região de Itabuna na Bahia, constituída de ipê (*Paratecoma peroba*), Itapicuru-preto (*Goniorrachis sp.*), itapicuru-amarelo (*Goniorrachis sp.*), pau-Brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.), jacarandá (*Dalbergia nigra*), putumuju (*Centrolobium robustum* Benth). Contemporâneamente, recebemos amostras de jacacandá-violeta (*Dalbergia cearensis* Ducke) — | *Leguminosae-*

*) "Den im Kernholz vieler Baeume, wenn nicht aller, vorhandenen Schutzstoffen gegen holzzerstörende Pilze kommt vielleicht noch einmal grosse technische Bedeutung zu, da ihre genauere Durchforschung sicherlich noch manches brauchbare Resultat geben wird. Es kann unter Umstaenden eine ganz neue Methode der Holzkonservierung gefunden werden. Das Gebiet ist noch viel zu wenig durchgearbeitet. Es waere zu wünschen, dass sich die Biochemiker mehr mit den natürlichen Abwehrstoffen des naturgewachsenen Holzes befassen würden. Hier kann die Bearbeitung des Gebietes der Antibiotika auch auf einem Gebiete, das nichts mit der Chemotherapie menschlicher und tierischer Krankheiten zu tun hat, ebenfalls schöne Früchte bringen".

-*Pap.* | — conservada à intempérie durante seis anos, como estaca de cêrca de um quintal, no Recife.

Posteriormente, obtivemos por nímia gentileza do Dr. Manoel Tavares, Executor do "Acôrdo" Florestal do Estado de Pernambuco, um exemplar de cerne de pau-Brasil de Pernambuco (*Caesalpinia echinata* Lam.).

Das sete espécies provadas, apenas a amostra de itapicuru-preto não apresentou atividade antimicrobiana, nas condições em que operámos, conforme adiante se expõe.

Quanto ao ipê de Itabuna, em virtude de suas afinidades com o "pau-d'arco-roxo" dêste Estado, quanto aos constituintes antibióticos, deu origem a um estudo mais detalhado que compõe outra comunicação a ser publicada em outra oportunidade.

MATERIAL E MÉTODOS

O método por nós adotado na pesquisa de antimicrobianos não voláteis, consiste em pôr em maceração durante 24 horas (com agitação) o material botânico triturado com cada um dos solventes: água pura, metanol, acetona ordinária, na relação 1:5 (p:v), à temperatura de laboratório (24-28º C), na obscuridade.

Os extratos, após ajustamento ao pH adequado, são provados pelo método de disco de papel de filtro sôbre cultivos de *B. subtilis* 9, *E. coli* R, *S. aureus*, *Mycobacterium smegmatis* e *C. albicans*.

Os discos de papel utilizados medem 15 mm de diâmetro, com uma capacidade de embebição de 0,14 ml.

Os halos de inibição são expressos em milímetros, pelos diâmetros que apresentem após o crescimento abundante de cada microorganismo de prova.

Os extratos utilizados nas provas quantitativas são preparados por repetidos tratamentos pelo solvente mais adequado, de quantidade pesada de material, segundo o que indique a prova preliminar de discos. O volume total de cada extrato é reduzido por evaporação a vácuo, em banho de 28º C, completado em seguida com solvente conveniente a volume conhecido, determinando-se o resíduo sêco e espectro antimicrobiano quantitativo pelo método de estria em diluição em gelose (Waksman & Reilly, 1945), ou por diluição em meio líquido.

No que se refere à solubilidade de cada substância ativa a estudar, e bem assim a certos dados de préstimo na esco-

lha do método a utilizar no isolamento de cada substância antibiótica, temos recentemente adotado como rotina, o método do "papirograma sumário" de Ishida *et. al.* (1951, 1952) modificado por Sevcík (1959) e que recebeu de um de nós (Gonçalves de Lima, 1959) uma nova variante visando melhor adequação à pesquisa de substâncias antimicrobianas de plantas superiores.

O método de Ishida (*Summarized Papergram, Zusammenfassendes Chromatogramm* ou ainda *Sammel-Chromogramm*) consiste na utilização de uma série de sistemas-solventes, no desenvolvimento papirográfico ascendente a curto trajeto, de maneira a ter-se, por revelação bioautográfica, uma valiosa súmula do comportamento físico-químico da substância em estudo.

Ishida & Miyazaki (1952) utilizaram na sua série, não sòmente sistemas de partição (butanol saturado de água; fenol a 80%; benzeno + metanol), como os de ação "salting out" (solução de $ClNH_4$ a 3%), os de ação eluente (acetona + água), e ainda os de cromatografia por precipitação, método proposto por Gapon (1948).

A série de Ishida & Miyazaki se constitui dos seguintes sistemas:

a) n-butanol saturado com água
b) $ClNH_4$ a 3%
c) fenol saturado de água (80% de fenol)
d) fenol (80%) saturado com água, em atmosfera de NH_3
e) acetona aquosa a 50%
f) 40 ml de n-butanol, 10 ml de metanol, 20 ml de água, 1,5 g de metilorange
g) 40 ml de n-butanol, 10 ml de metanol e 20 ml de água
h) 80 ml de benzeno, 20 ml de metanol.

As provas de papirografia sumária se realizam com tiras de papel Whatman n.° 1, de 17 x 1 cm, desenvolvendo-se os cromatogramas em tubos de aproximadamente 18 x 4 cm.

A série eluotrópica de Sevcík se constitui do seguinte grupo de solventes:

1) água destilada
2) solução aquosa de cloreto de amônio a 3%

3) metanol a 96%
4) acetona
5) acetato de etila (saturado com água)
6) n-butanol (saturado com água)
7) éter etílico (saturado com água)
8) clorofórmio
9) benzeno
10) éter de petróleo.

Na aplicação do citado método no campo dos antimicrobianos de vegetais superiores, julgou um de nós (Gonçalves de Lima, 1959) conveniente u'a nova alteração, introduzindo na série solventes reativos: a) solução aquosa alcalina (tampão fosfato pH 8,0); b) solução aquosa saturada de ácido pícrico; c) solução de cloreto de ferro a 3%, "neutra".

Com o emprêgo de tal série se alarga a informação mais além do comportamento eluotrópico de Ishida e Sevcík, com indicação da conduta do princípio ativo frente a dois reativos de precipitação de dois grupos encontradiços no reino vegetal: alcalóides e taninos.

Além da solução de cloreto de amônio a 3%, que òbviamente sobreleva a ação aniônica da celulose, foi incluída a solução tampão de pH 8,0 que pode proporcionar em determinados casos, outra valiosa notícia sôbre o caráter iônico da substância, sendo também relevante a indicação que tal reativo pode oferecer sôbre a labilidade do antimicrobiano frente a um pH moderadamente alto, um informe de utilidade na conduta ulterior do pesquisador nas operações de isolamento e purificação da substância buscada.

Em determinados casos, como no estudo de bignoniáceas contendo os antibióticos lapachol e xiloidina, foi constatado que os cromatogramas sumários eram idênticos para espécies tomadas como bastante diferentes, a uma diagnose superficial, permitindo uma inferência taxonômica através de seus comportamentos químico-biológicos. O mesmo ocorreu em relação às amostras de pau-Brasil de Itabuna e de Pernambuco. Em tais casos se comprovou como pode ser de valia tal método, na identificação fitoquímica de material botânico, ademais de possibilitar, de maneira singela, estabelecer afinidades e distinções químicas qualitativas, como importante subsídio à taxonomia, utilizando-se diretamente o extrato bruto da planta, a pH adequado.

A série por nós adotada, consiste pois, dos seguintes têrmos:

1) água destilada
2) solução de cloreto de amônio a 3%
3) id. tampão de fosfato (pH 8,0)
4) id. aquosa saturada de ácido pícrico
5) id. de cloreto de ferro (III) a 3%, "neutro"
6) metanol
7) acetona
8) acetato de etila saturado de água
9) n-butanol saturado de água
10) éter etílico saturado de água
11) clorofórmio
12) benzeno
13) éter de petróleo.

Quanto ao desenvolvimento dos cromatogramas e técnica de revelação, obedecem ao que foi proposto originalmente por Ishida.

RESULTADOS

No quadro I são apresentados os resultados obtidos pelo método de disco de papel com extratos das madeiras estudadas, sendo de notar a sensibilidade demonstrada, em relação às amostras analisadas, por *S. aureus*, seguindo-se-lhe *B. subtilis* 9. A ocorrência de antibiótico ativo contra *E. coli* foi verificada na amostra de itapicuru-amarelo (*Goniorrachis sp.*) embora *dèbilmente* (fig. 1). Também foram ativos contra tal germe os extratos de pau-Brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.), de jacarandá (*Dalbergia sp.*) (fig. 2) e de jacarandá-violeta (*Dalbergia cearensis* Ducke). Contra *Candida albicans* sòmente apresentaram atividade as amostras de putumuju (*Centrolobium robustum* Benth) e de jacarandá (fig. 3), sendo digna de registo a atividade demonstrada pelos extratos aquosos dêste último, contra aquela levedura. Em relação a *Myc. smegmatis*, ofereceu o putumuju grandes halos irregulares em seus extratos metanólico e acetônico (fig. 4). A formação de halos irregulares por extratos de putumuju é repetida em cultivos de *B. subtilis* (fig. 5) e de *St. aureus* (fig. 6), fenômeno dependente, ao nosso entender, da fraca hidrossolubilidade da substância ativa. Mais regulares, embora menores, foram os halos apresentados nos mesmos solventes pelo jacarandá (fig. 7), contra *Myc. smagmatis*.

QUADRO I

Atividade dos extratos das madeiras (método de disco de papel). Diâmetros de inibição em mm

MADEIRAS	*B. subtilis* 9			*E. coli* R			*St. aureus*			*C. albicans*			*Myc. smegmatis*		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Ipê	—	27	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	30 *
Itapicuru-preto	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Itapicuru-amarelo	—	—	—	—	20	—	—	22	20	—	—	—	—	—	—
Pau-Brasil	—	22	—	—	—	23	23	24	30	—	—	—	—	25	—
Jacarandá	22	27	31	—	30	37	28	39	41	28 §	30 §	35 §	—	30	35
Putumuju **	—	37—60	45—55	—	—	—	—	30	40	—	40	30	—	45—50	40—55
Jacarandá-violeta	—	20	25	—	25	22	—	28	26	—	—	—	—	20	25

A) — extrato aquoso
B) — extrato metanólico
C) — extrato acetônico
*) — *Myc. phlei* — extrato acetônico com halo de 30 mm.
Myc. humanus — extrato acetônico com 28 mm
**) — Halo irregular
§ — Halo sem contôrno nítido.

Ainda em relação aos três solventes usados (água, metanol e acetona), foi constatado, também nessa oportunidade, um fato que vimos observando em vários anos de experiência de pesquisa nesse campo: os antibióticos hidrossolúveis são pouco freqüentes no mundo vegetal superior. A ocorrência de moléculas ativas solúveis em solventes orgânicos, prevaleceu assim nos resultados que compuseram a presente comunicação. Apenas no jacarandá (Itabuna) e no pau-Brasil, foi verificada a existência de antibiótico hidrossolúvel. No primeiro, formaram-se halos muito bem definidos, de seu extrato aquoso, contra *St. aureus* (28 mm) (fig. 8). No pau-Brasil (fig. 9) é de notar que o halo do extrato acetônico superou (com 30 mm) os outros dois (aquoso e metanólico, respectivamente 23 e 24 mm). Também se observou hidrossolubilidade do antibiótico do jaca-

randá, embora com menor diâmetro, contra *B. subtilis* 9 (22 mm) (fig. 10). Com o *Myc. smegmatis* apenas se nota uma débil inibição causada pelo extrato aquoso da mesma madeira, embora os halos obtidos de extratos metanólico e acetônico sejam consideráveis (30 mm e 35 mm, respectivamente) (fig. 11). Contra *Candida albicans* foram observados, como já referimos, em extratos da mesma madeira com três solventes, halos sem contornos nítidos, menores todavia no extrato aquoso (foto 3).

A ação verificada contra *E. coli* R., prevaleceu nos extratos da mesma madeira, obtidos com os dois solventes orgânicos, especialmente a acetona, com um halo irregular de 37 mm. A inibição provocada pelo extrato aquoso foi apenas notada, conforme se observa na fotografia n.° 2, já referida.

Quanto ao jacarandá-violeta (*Dalbergia cearensis* Ducke) foram pequenos os halos contra *B. subtilis* e *St. aureus* (fig. 12 e 13), sòmente de extratos metanólico e acetônico.

CROMATOGRAMAS SUMÁRIOS DOS ANTIMICROBIANOS EXISTENTES NOS EXTRATOS

Utilizando a modificação por nós adotada, foram obtidos cromogramas sumários das substâncias antibióticas presentes nas várias amostras, segundo se pode observar nas fotos que apresentamos a seguir.

A insolubilidade em água do antimicrobiano do putumuju é manifesta (fig. 14), não se deslocando também por "salting out", nem apresentando aparentemente caráter acídico. Sem embargo, a sua solubilidade em solventes orgânicos polares (metanol, etc.) e sua insolubilidade em éter de petróleo, são dados valiosos na conduta a seguir nas tentativas de seu isolamento e purificação. O cromograma da amostra de jacarandá (fig. 15) revela hidrossolubilidade do antimicrobiano. É de notar a interferência manifestada pelo cloreto férrico; solubilidade excelente ou moderada na maioria dos solventes orgânicos, com exclusão de éter de petróleo. Como um exemplo a calhar, compare-se o cromatograma anterior (do jacarandá) com o do jacarandá-violeta (fig. 16). A hidro-insolubilidade neste é patente: uma distinção fundamental.

Outro exemplo interessante se apresenta nos cromatogramas obtidos com duas amostras de pau-Brasil de procedência muito diversa. Um dêles (fig. 17) que deriva de u'a

QUADRO II

Espectros antimicrobianos dos resíduos sêcos de extratos (acetônicos ou alcoólicos) de jacarandá, putumuju, Jacarandá-violeta, pau-Brasil, itapicuru-amarelo

MICROORGANISMOS	mcg/ml				
	JACARANDÁ	PUTUMUJU	JACARANDÁ VIOLETA	PAU-BRASIL	ITAPICURU-AMARELO
B. subtilis 9	50 - 80	50 - 80	250 - 300	> 300	> 300
S. aureus	10 - 20	50 - 80	100 - 140	180 - 200	180 - 200
B. anthracis	10 - 20	20 - 40	80 - 100	100 - 140	140 - 180
B. mycoides	20 - 40	20 - 40	140 - 180	200 - 250	> 300 -
Sar. lutea	5 - 10	5 - 10	140 - 180	200 - 250	> 300
Str. hemolyticus	50 - 80	200 - 250	180 - 200	200 - 250	200 - 250
N. catharralis	50 - 80	50 - 80	250 - 300	200 - 250	> 300
E. coli R.	50 - 80	> 300	100 - 140	100 - 140	> 300
K. pneumoniae	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
S. typhosa	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
Sh. paradysenteriae	140 - 180	> 300	> 300	> 300	> 300
Myc. tub. var. hominis	140 - 180	40 - 60	> 300	> 300	> 300
Myc. phley	50 - 80	20 - 40	100 - 140	180 - 200	180 - 200
Myc. smegmatis	140 - 180	20 - 40	180 - 200	250 - 300	> 300
N. asteroides	20 - 40	20 - 40	100 - 140	> 300	> 300
Br. suis	80 - 100	10 - 20	100 - 140	200 - 250	140 - 180
Br. melitensis	10 - 20	10 - 20	50 - 80	180 - 200	100 - 140
Br. abortus	50 - 80	80 - 100	50 - 80	180 - 200	140 - 180
C. albicans	80 - 100	100 - 150	> 300 -	> 300	> 300
C. kruzei	60 - 80	80 - 100	200 - 250	200 - 250	180 - 200
C. parakruzei	150 - 200	150 - 200	250 - 300	> 300	> 300
C. tropicalis	80 - 100	100 - 150	> 300	> 300	> 300
C. pseudo-tropicalis	150 - 200	150 - 200	> 300	> 300	> 300
C. stellatoidea	20 - 40	40 - 60	140 - 180	200 - 250	180 - 200
P. morganni	10 - 20	140 - 180	100 - 140	100 - 140	> 300
Ps. aeruginosa	200 - 250	> 300	> 300	250 - 300	> 300
Cr. neoformans	150 - 200	60 - 80	250 - 300	> 300	> 300
1a. *Polystictus sanguineus*	80 - 100	60 - 80	150 - 200	> 300	> 300
9 - *Polystictus sp.*	200 - 300	200 - 300	> 300	200 - 300	> 300
11 - *Stereum sp.*	150 - 200	100 - 150	> 300	> 300	200 - 300
14 - *Hypolyssus sp*	200 - 300	50 - 100	> 300	> 300	> 300
17 - *Polysporus sp*	> 300	200 - 300	> 300	> 300	> 300
2 - *Favolus sp*	200 - 300	150 - 200	> 300	> 300	> 300

amostra originária de Itabuna (Bahia) apresenta antimicrobiano com hidrossolubilidade moderada, com incremento de solubilidade por elevação de pH (indício de caráter acídico); solubilidade em solventes orgânicos polares; insolubilidade em clorofórmio, benzeno e éter de petróleo.

O cromatograma da amostra de Pernambuco (foto 18) oferece em suas linhas gerais o quadro idêntico, inclusive o mesmo discreto deslocamento do ponto de aplicação no sistema 3 (tampão pH 8,0). Também é interessante a ação observada do sistema 4 (solução aquosa saturada de ácido pícrico).

ESPECTRO ANTIMICROBIANO DOS EXTRATOS BRUTOS DAS MADEIRAS

Com o objetivo de oferecer uma representação das atividades apresentadas pelos resíduos obtidos por evaporação dos extratos das madeiras que exibiram ação antimicrobiana, foram conseguidos os seus espectros (quadro 2) incluindo não sòmente os germes usuais, como também espécies de basidiomicetos dos gêneros *Polystictus*, *Stereum*, *Hypolyssus*, *Polyporus* e *Favolus*, todos recentemente isolados das matas do Horto Zoobotânico de Dois Irmãos, em cultivo em meio artificial pelo ilustre micólogo, nosso hóspede, professor Carrol W. Dodge e sua digna espôsa Dra. Bertha S. Dodge.

Ressalta a atividade demonstrada pelo jacarandá e o putumuju, o primeiro oferecendo sem qualquer purificação, valores realmente dignos de atenção, principalmente contra *S. aureus*, *B. anthracis*, *P. morganii*, *C. stellatoidea*.

Contra o *Polystictus sanguineus* sua concentração mínima de inibição foi de 80 — 100 mcg/ml, sòmente superado pelo putumuju, o qual foi ativo na concentração de 60 — 80 mcg/ml.

A ação do extrato de putumuju foi considerável, contra espécies dos gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Brucella*, *Candida*, *Cryptococcus* e contra os basidiomicetos *Stereum* e *Hypolyssus*, além de *Polystictus sanguineus*. Quanto ao jacarandá-violeta, é preciso referir mais uma vez que sua amostra era velha, de pelo menos seis anos de cortada e, durante todo êsse tempo, deixada à intempérie, ao clima do Recife. Apesar disso, apresentou boa atividade relativa contra *Brucella spp.* Em relação aos basidiomicetos, apenas apresentou ação apreciável contra *P. sanguineus*.

O pau-Brasil (da Bahia) e o itapicuru-amarelo, apre-

sentaram nos seus resíduos atividades inferiores aos demais anteriormente citados, isto não podendo ter, òbviamente, significado conclusivo sôbre as características de cada um dos antibióticos quando isolados e purificados.

É evidente que sobretudo as madeiras denominadas jacarandá e putumuju possuem, a julgar pelos nossos resultados *in vitro*, concentrações de antimicrobianos em tais valores que, muito presumìvelmente, possibilitam proteção contra alguns fungos, principalmente *Polystictus sanguineus*, *Stereum sp.*, *Hypolyssus sp.* e *Favolus*, segundo se pode concluir dos dados expressos no quadro III. No caso do jacarandá-violeta, cuja condição especial da amostra lhe confere uma valia excepcional, há a destacar a ação do seu extrato sôbre *G. sanguineus*, correspondendo a 7.600 unidades por grama de madeira.

A ação do extrato do pau-Brasil sôbre os basidiomicetos, é inferior às demais espécies provadas. Do mesmo modo, o itapicuru-amarelo, que apenas se destaca em relação ao *Stereum*, com 1.200 u/g.

QUADRO III

Atividades nos resíduos (unidades/mg)

	Jacarandá	Putumuju	Jacarandá Violeta	Pau-Brasil	Itapicuru-amarelo
Polystictus sanguineus	11	142	57	—	—
Polystictus sp.	4	4	—	—	—
Stereum sp.	57	8	—	4	4
Hypolyssus sp.	4	133	—	—	—
Polyporus sp.	—	4	—	—	—
Favolus sp.	4	57	—	—	—

QUADRO IV

Atividades na madeira (unidades/g)

	Jacarandá	Putumuju	Jacarandá Violeta	Pau-Brasil	Itapicuru-amarelo
Polystictus sanguineus	2.300	22.900	7.600	—	—
Polysticius sp.	800	600	—	—	—
Stereum sp.	11.800	1.300	—	400	1.200
Hypolyssus sp.	800	21.400	—	—	—
Polyporus sp.	—	600	—	—	—
Favolus sp.	800	9.200	—	—	—

DISCUSSÃO

Os resultados por nós obtidos com a investigação de antimicrobianos, empreendida em amostras de madeira-de-lei do Brasil oferecem fundamento à realização de um programa amplo em tal campo.

Nas provas preliminares realizadas em sete espécimes, seis apresentaram nos seus extratos, atividades excelentes, sendo que duas delas — o jacarandá e o putumuju, ambos da região de Itabuna, na Bahia — apresentaram espectros antimicrobianos de real interêsse, reclamando à continuação das pesquisas, até o isolamento, purificação e determinação das propriedades físico-químicas dos antibióticos nelas existentes. O papel que talvez desempenhem tais antimicrobianos — alguns dêles com ação contra fungos prejudiciais às madeiras de construção — na resistência de tais materiais aos agentes microbiológicos de deterioração, é assunto digno de exame. A êste propósito, convém atentar no que havemos constatado com a amostra de jacarandá-violeta (*Dalbergia cearensis* Ducke), a qual apesar do largo tempo de permanência à intempérie, ainda apresenta nos seus extratos atividade contra *Polystictus sanguineus* correspondente a 7.600 unidades por grama de madeira, o que parece de importância como ação antibiótica. É, pois, de crer que tais princípios ativos tenham parte na resistência à deterioração por agentes microbianos que

certas madeiras exibem, sobretudo quando o antimicrobiano (às vêzes mais de um) é uma substância estável, como o lapachol e a xiloidina.

SUMMARY

The authors present the results of an investigation on the antimicrobian action of the extracts from samples of timbers for construction of very good quality, the most of them from region of Itabuna in Bahia (Brazil).

A modification of the summarized papergram of Ishida *et al.*, with enlargement of the serie of Sevcík is presented, proposed by one of us (Gonçalves de Lima), as a more adequate process to the avaliation of the papyrographic behavior of each substance, before its isolation, composed of pure solvents and systems of partition, of precipitation and salting out action and of some chemicals.

The authors call attention to the advantage of the use of this summarized chromogram as an aid to the methods of botanical identification.

Good activity in the extract of "jacarandá" (*Dalbergia sp.*) was found which dry residue without any purification presented activities from from 5 — 10 mcg/ml to *S. aureus*, from 10 — 20 mcg/ml to *Proteus morganii*, with important activities against some basidiomycete species.

A great antimicrobian action was also verified in the sample of another wood considered of superior quality, the "putumuju" (*Centrolobium robustum* Benth), with outstanding activity against *Polystictus*, *Stereum*, *Hypolyssus* and *Favolus* species.

The authors consider that certain durable antimicrobians that exist in the qualified timbers represent a role in their resistence against the destructive action of the microorganisms.

The special case of "jacarandá-violeta" (*Dalbergia cearensis* Ducke) is of great importance, possessing after six years of exposure, good antibiotic percentage.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verfasser legen die Untersuchungsergebnisse ueber die antimikrobielle Taetigkeit von Auszuegen einiger Muster von verschiedener Bauholzern guter Qualitaet vor, welche

ihrer Mehrheit aus der Gegend von Itabuna, im Staate Bahia (Brasilien) stammen.

Eine Abaenderung des "Sammel-Chromatogramms" von Ishida *et al.* wird vorgelegt mit Erweiterung der Serie von Sevcík und von einen von uns (Gonçalves de Lima) vorgeschlagen, welches eine Vereinigung zu geeigneterer Auswertung des papierchromatischen Verhaltens jedweder Substanz vor iher Isolierung darstellt und wobei es sich unter Anderem um reine Loesungsmittel, Verteilungsverfahren, Ausfaellung und die "salting out" Aktion sowie um festbestimmte Reagenzien handelt.

Die Nuetzlichkeit einer Anwendung besagten Sammelchromatogramms als Beitrag zu den Methoden der Pflanzen--Identifizierung wird unterstrichen.

Eine ausgezeichnete Wirksamkeit wurde auch in Extrakten vom Holz Jacarandá (*Dalbergia sp.*) festgestellt, dessen Trockenrueckstand ohne irgend welche Reinigung eine Taetigkeit von 5-10 mcg/ml gegen *S. lutea* besitzt, sowie 10-20 mcg/ml gegen *S. aureus* und 10-20 mcg/ml gegen *Proteus morganii* besitzt; auch zeigte sich eine hervorragende Wirkung gegen Arten der Basidiomyceten.

Eine bemerkungswerte antimikrobielle Taetigkeit wurde im Muster eines anderen Holzes festgestellt, welches eine hoehere qualitative Bewertung besitzt, naemlich im Putumuju (*Centrolobium robustum* Benth) mit seiner sehr auffalenden Taetigkeit gegen Arten von *Polystictus*, *Stereum*, *Hypolyssus* und *Favolus*.

Die Verfasser sind der Meinung, dass gewisse, in Qualitaetshoelzern vorkommene antimikrobielle Substanzen eine Rolle der Widerstandsfaehigkeit gegen die zerstoerenden Aktionen der Mikroorganismen spielen.

Es wird auch der Sonderfall des violetten Jacarandá (*Dalbergia cearensis* Ducke) besprochen, das trotz 6 Jahre den Unbilden der Witterung ausgesetzt, gute antibiotische Wirkung zeigte.

RESUMÉ

Les auteurs présentent les résultats d'une recherche sur l'action antimicrobienne d'échantillons de bois de construction de bonne qualité, en provenance surtout de la région d'Itabuna, de l'État de Bahia (Brésil).

On présente une modification du "chromatogramme sommaire" de Ishida *et al.*, avec augmentation de la série de Sevcík, proposée par l'un de nous (Gonçalves de Lima),

pour former un ensemble mieux adapté à l'évaluation du comportement papyrographique de chaque substance, avant son isolement, ensemble comprenant solvants purs et systèmes de partage, de précipitation et d'action "salting out" et de réactifs déterminés.

Les auteurs attirent l'attention sur l'utilité de l'emploi de ce chromatogramme sommaire pour relayer les méthodes d'identification botanique.

On a constaté une excellente activité dans l'extrait de jacarandá (*Dalbergia sp.*), dont le résidu sec sans aucune purification a présenté des activités de 5-10 mcg/ml pour *S. lutea*, de 10-20 mcg/ml pour *Str. aureus*, de 10-20 mcg/ml pour *Proteus morganii*, avec une activité importante pour certaines espéces de basidiomycètes.

On a également relevé une action antimicrobienne appréciable sur un échantillon d'un autre bois considéré de qualité supérieure, le putumuju (*Centrolobium robustum* Benth), avec une activité particulière contre des espèces de *Polystictus*, *Stereum*, *Hypolyssus* et *Favolus*.

Les auters considèrent que certaines substances antimicrobiennes stables existant dans les bois de qualité, jouent un rôle dans leur résistance à l'action destructive de microorganismes.

On porte un jugement sur le cas spécial du jacarandá-violeta (*Dalbergia cearensis* Duck), qui possède après six années d'exposition aux intempéries, une bonne teneur en antibiotiques.

Queremos agradecer aos professôres Dárdano de Andrade Lima e Calvino Mainieri, pela valiosa contribuição taxonômica ao material botânico do presente trabalho.

REFERÊNCIAS

GONÇALVES DE LIMA, O., IVAN D'ALBUQUERQUE et M. MACHADO, Primeiras observações sôbre a ação antimocrobiana do Lapachol. *An. da Soc. de Biol. de Pernambuco 1, 2;* 129 (1956).

GONÇALVES DE LIMA, O. IVAN D'ALBUQUERQUE et M. MACHADO, Uma nova substância isolada do "Pau d' Arco", *Tabebuia sp. An. Soc. Biol. de Pernambuco 1, 2;* 136 (1956a).

GONÇALVES DE LIMA, O., Comunicação à Sociedade de Biologia de Pernambuco em Sessão realizada a 25 de setembro de 1959.

ISHIDA, N., T. SHIRATORI, S. OKAMOTO, J. MIYAZAKI, Studies on the antibiotic substances from actinomyces. XIX. On the identification of many antibiotics by paperchromatographic method. *J. Antibiotics (Jap.)* 4, 505 (1951).

ISHIDA, N., M. MIYAZAKI, Studies on the antibiotic substances from actinomyces. XXI. On the identification of many antibiotics by papyrographic method, II. *J. Antibiotics (Jap.)* 5: 481 (1952).

SEVCÍK, V., Conferência pronunciada no IAUR em 26 de agôsto de 1959, pág. 7.

UEDA, K., Y. OKIMOTO, H. SAKAI & K. ARIMA, Antibiotic Against Silkworm Jaundice Virus, Grasseriomycin, Produced by *Streptomyces* species. *J. Antibiotics, Ser. A*, Vol. *VIII*, 91 (1955).

WAKSMAN, S. A., and REILLY, H. C., Agar-streak Method. *Ind. Eng. Chem. Analyt. Ed. 17*: 556 (1945).

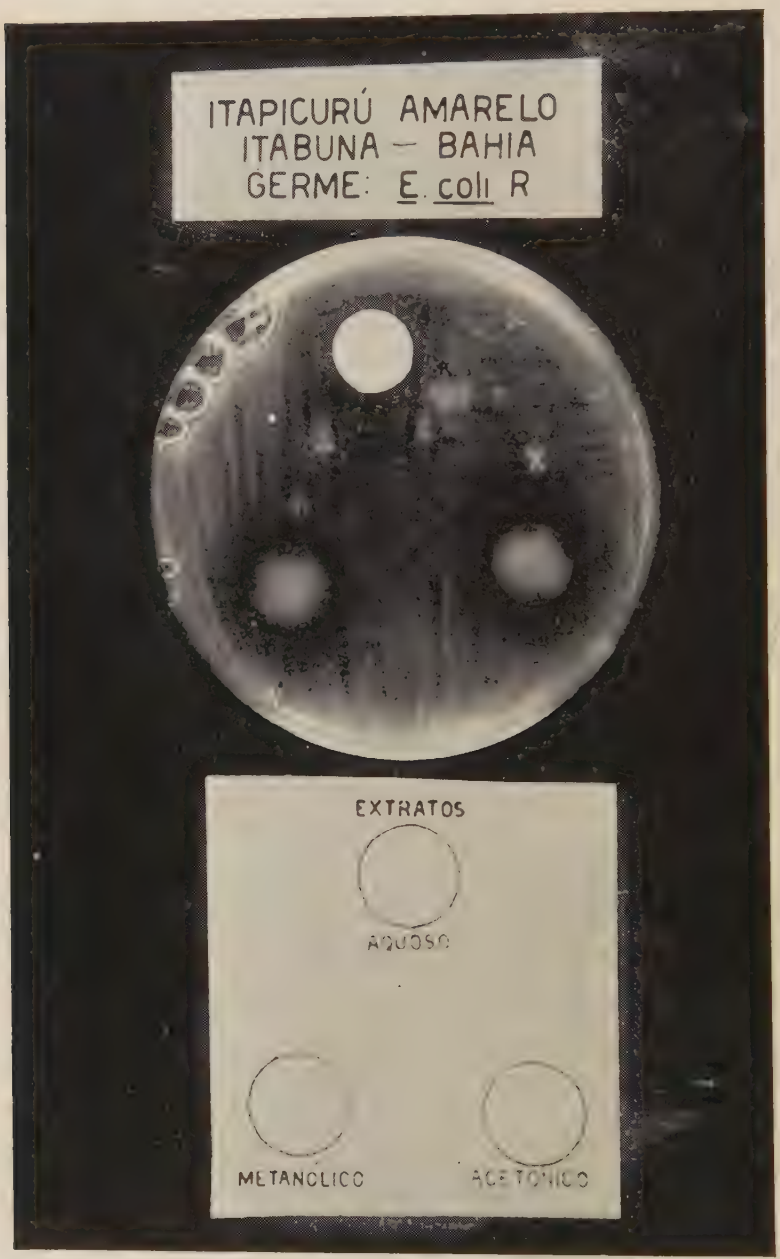

ITAPICURÚ AMARELO
ITABUNA — BAHIA
GERME: E. coli R
EXTRATOS
AQUOSO
METANOLICO
ACETONICO

Fig. 1

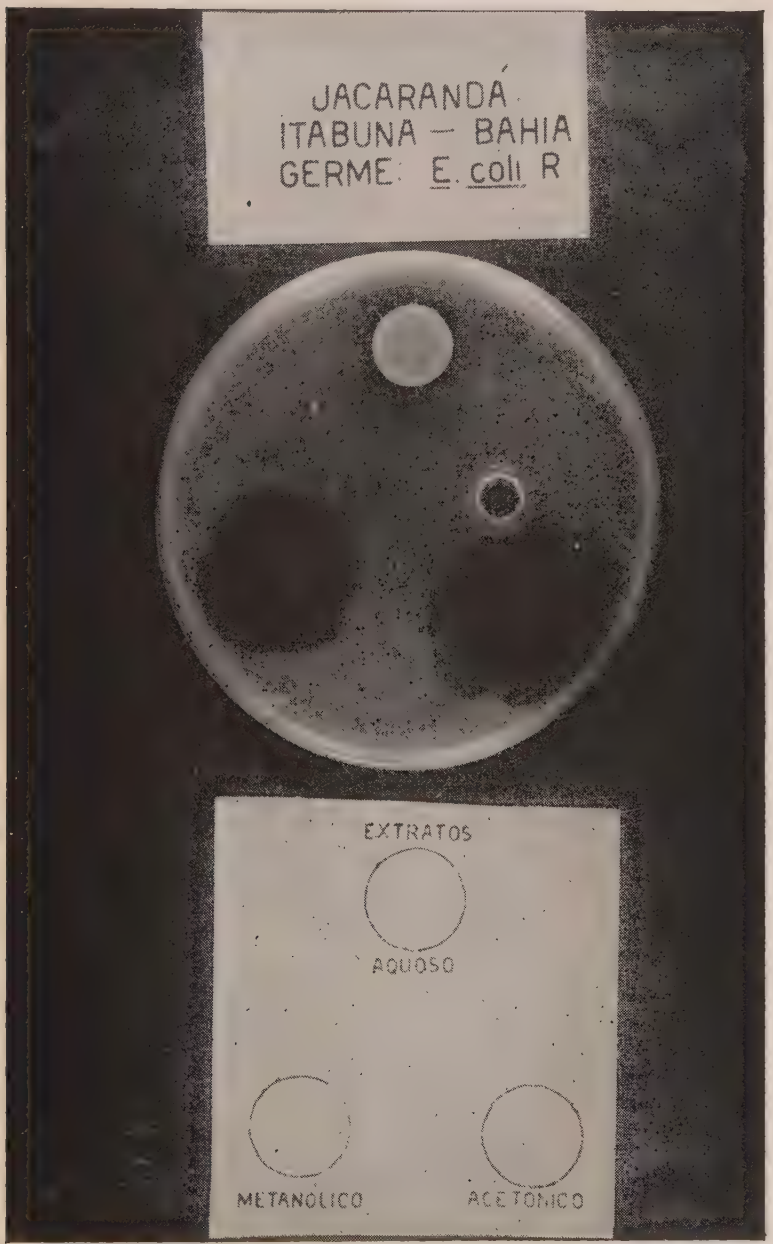

JACARANDÁ
ITABUNA — BAHIA
GERME: E. coli R
EXTRATOS
AQUOSO
METANÓLICO
ACETÔNICO

Fig. 2

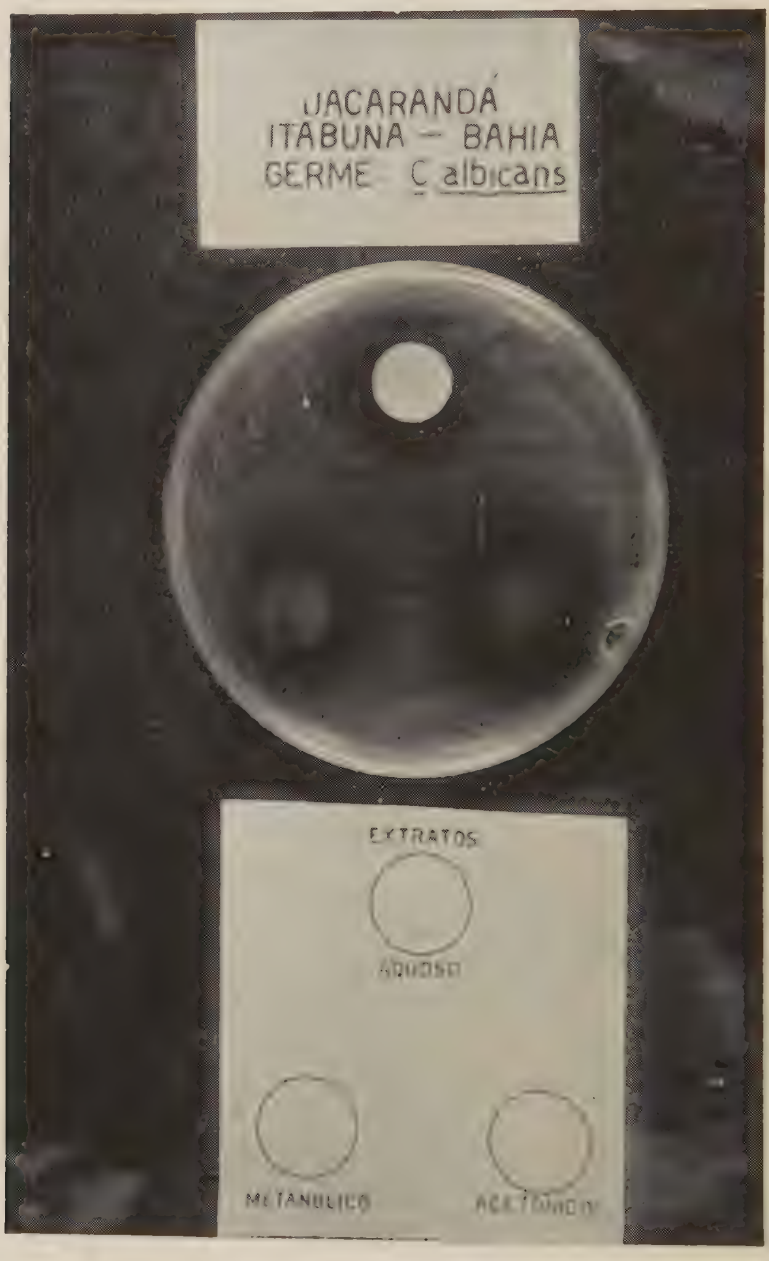

JACARANDÁ
ITABUNA – BAHIA
GERME C albicans
EXTRATOS
AQUOSO
METANÓLICO
ACETÔNICO

Fig. 3

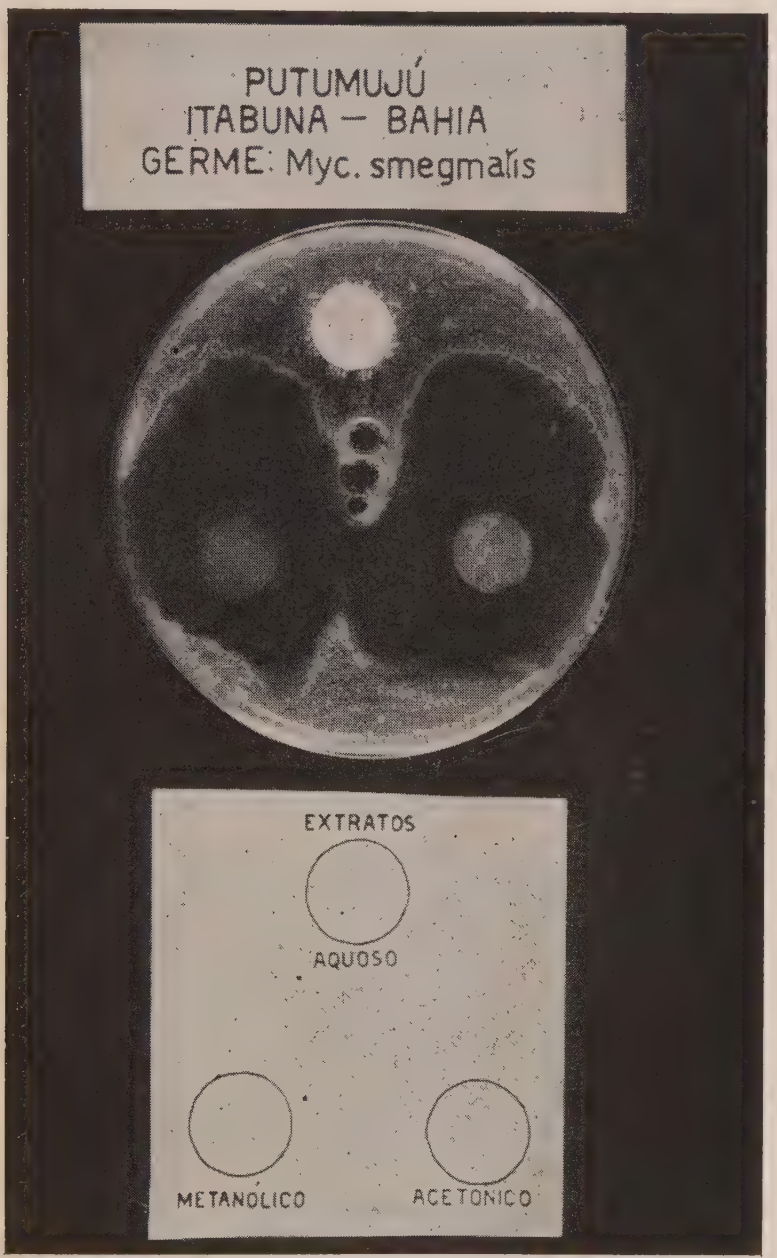

PUTUMUJÚ
ITABUNA — BAHIA
GERME: Myc. smegmaris
EXTRATOS
AQUOSO
METANOLICO
ACETONICO

Fig. 4

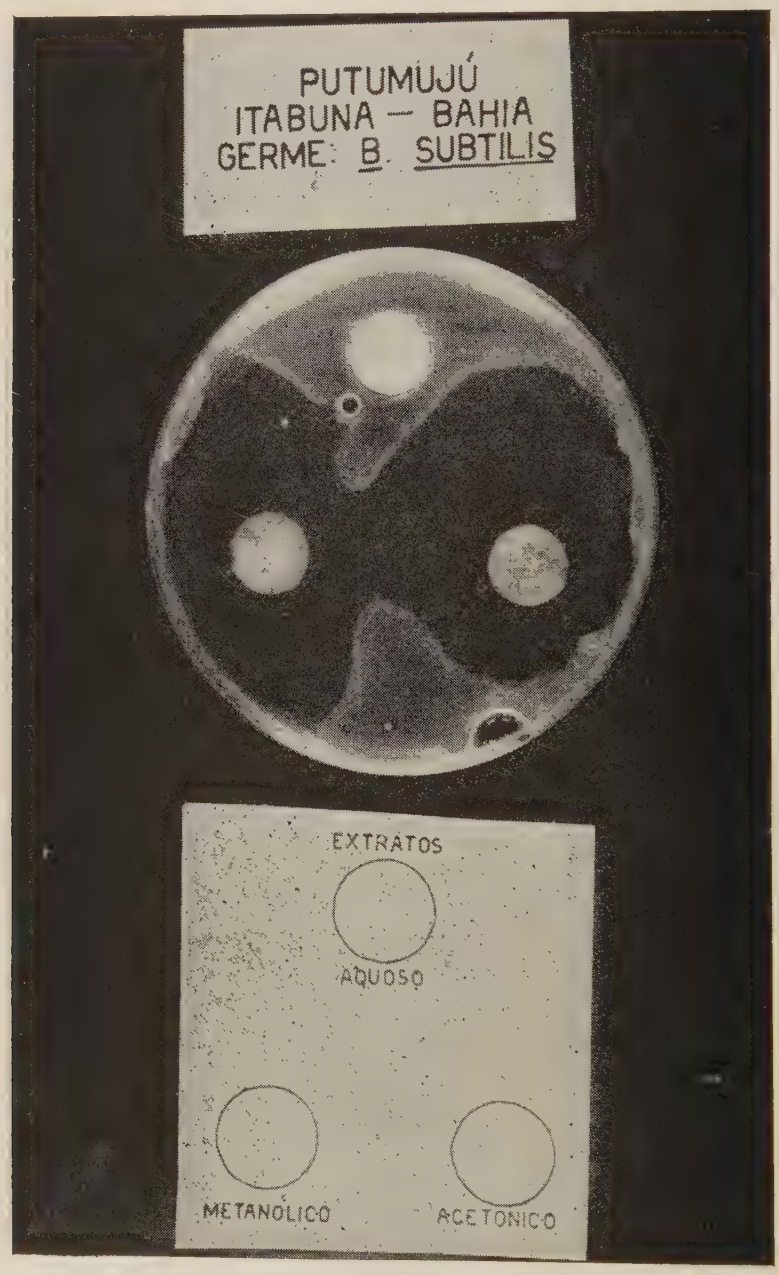

PUTUMUJÚ
ITABUNA – BAHIA
GERME: B. SUBTILIS
EXTRATOS
AQUOSO
METANÓLICO
ACETÔNICO

Fig. 5

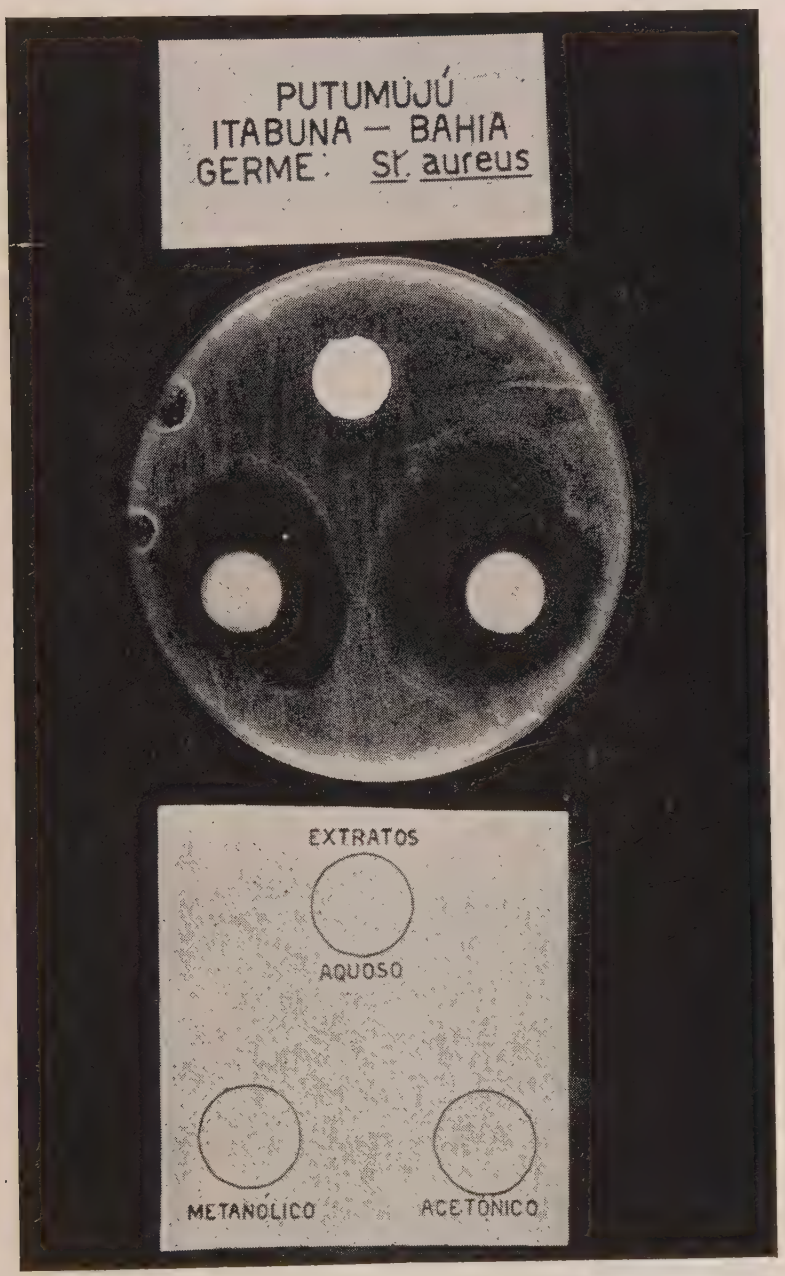

PUTUMUJÚ
ITABUNA — BAHIA
GERME: St. aureus
EXTRATOS
AQUOSO
METANÓLICO
ACETÔNICO

Fig. 6

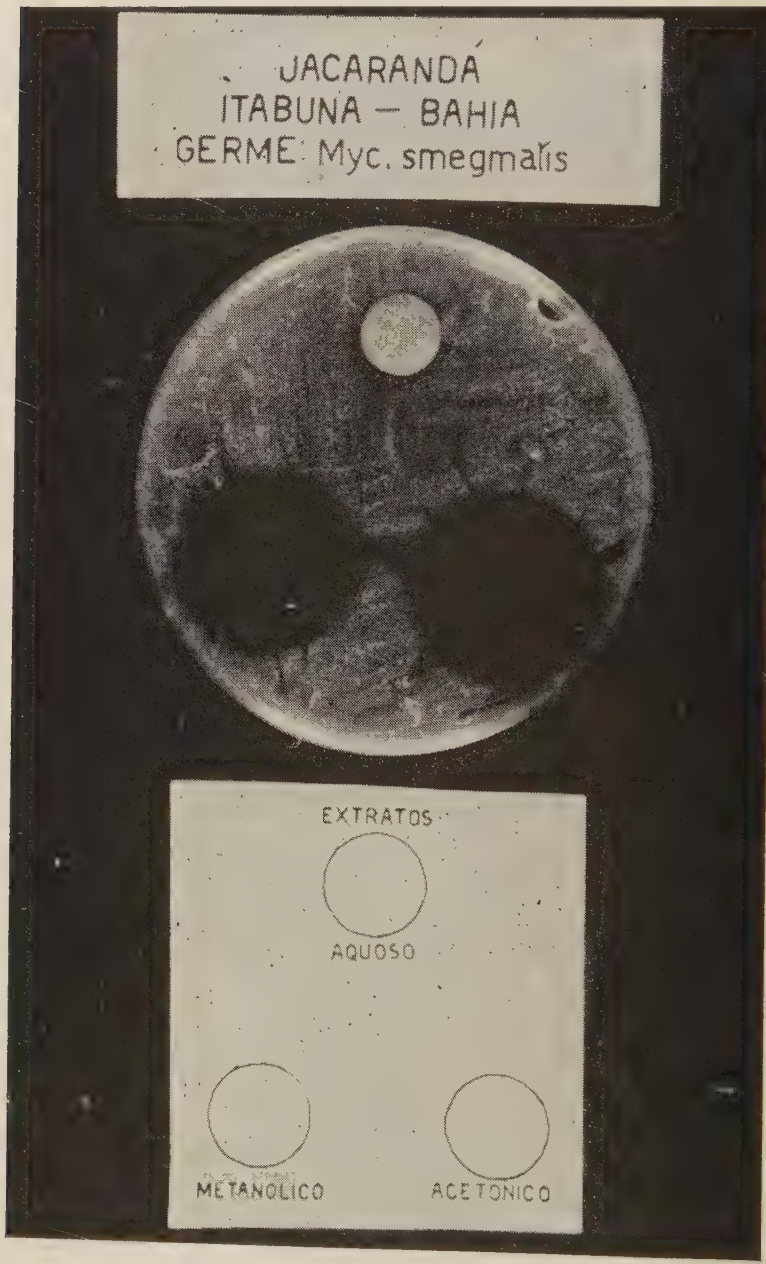

JACARANDÁ
ITABUNA — BAHIA
GERME: Myc. smegmatis
EXTRATOS
AQUOSO
METANOLICO
ACETONICO

Fig. 7

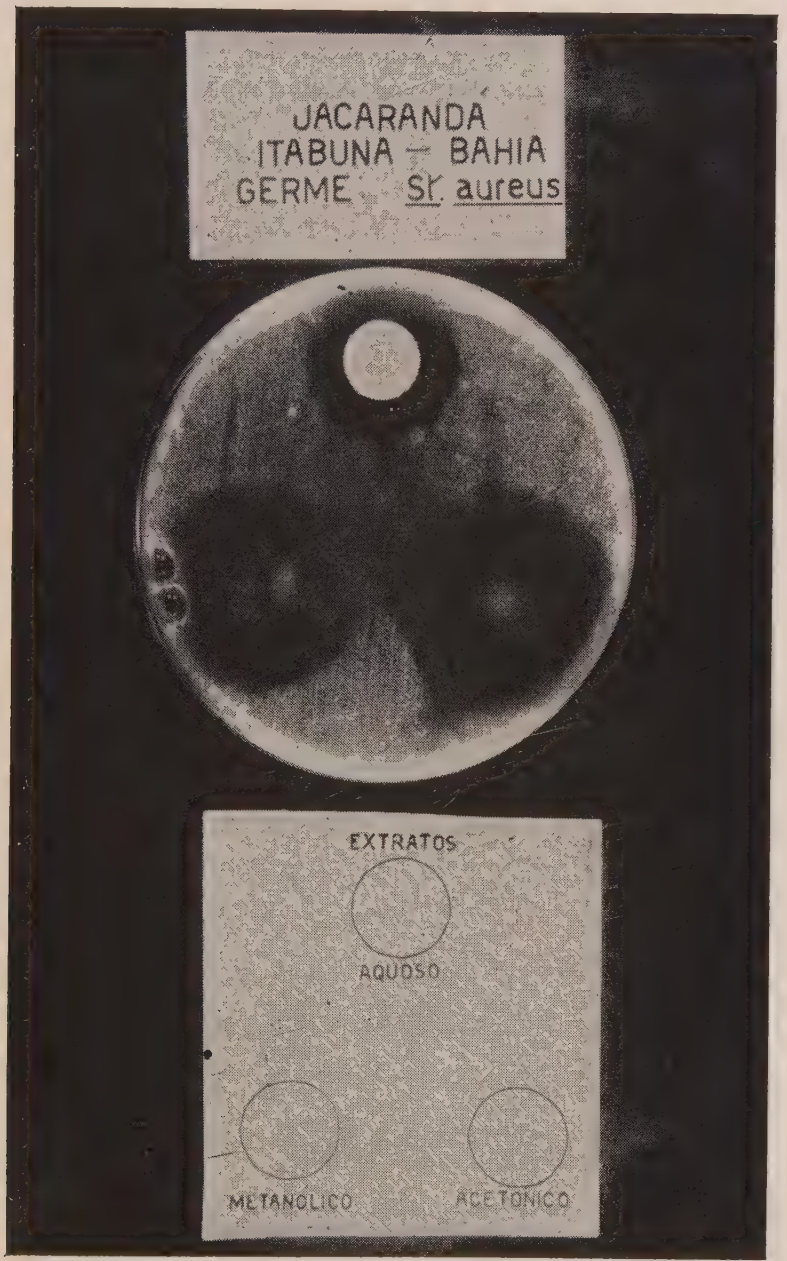

JACARANDÁ
ITABUNA – BAHIA
GERME St. aureus
EXTRATOS
AQUOSO
METANOLICO
ACETONICO

Fig. 8

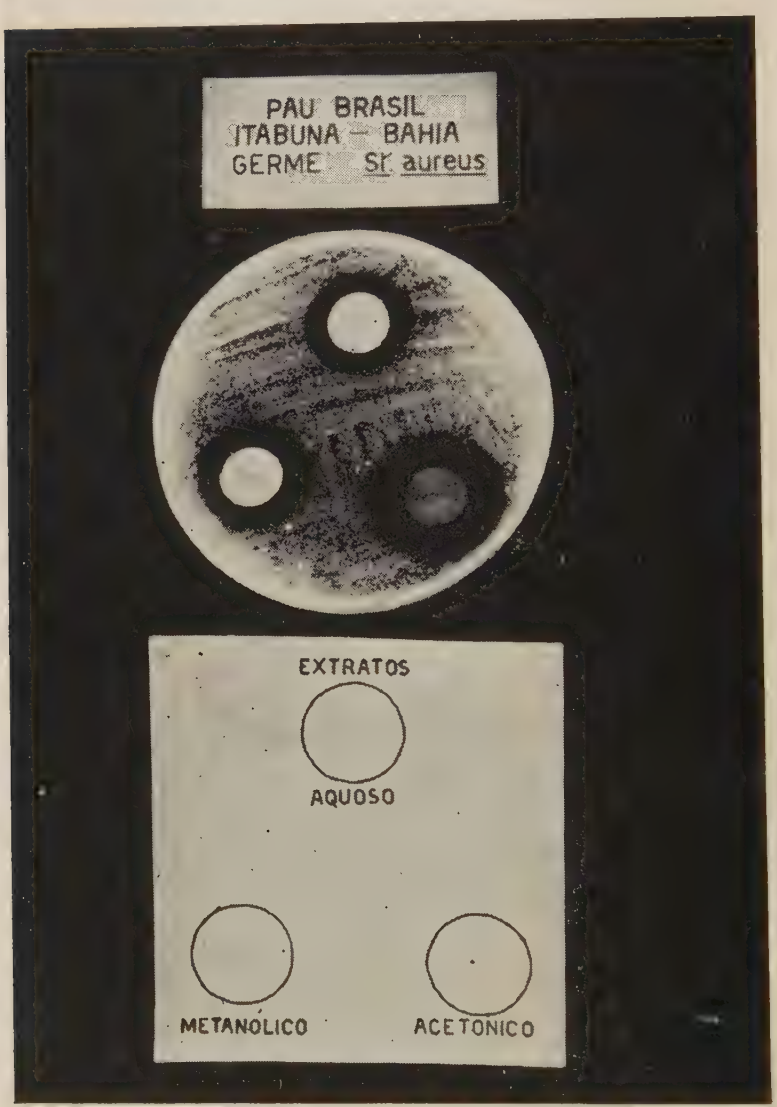

PAU BRASIL
ITABUNA – BAHIA
GERME St. aureus
EXTRATOS
AQUOSO
METANÓLICO
ACETONICO

Fig. 9

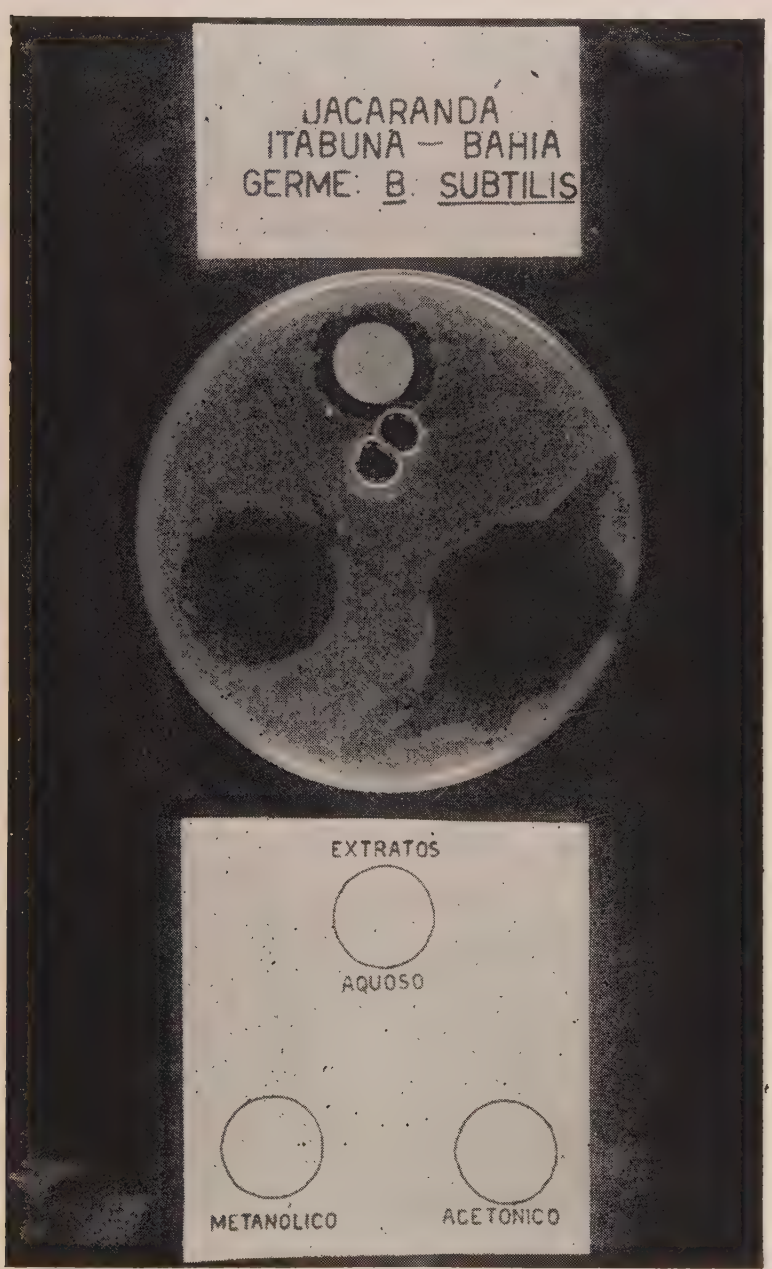

JACARANDÁ
ITABUNA — BAHIA
GERME: B. SUBTILIS
EXTRATOS
AQUOSO
METANÓLICO
ACETÔNICO

Fig. 10

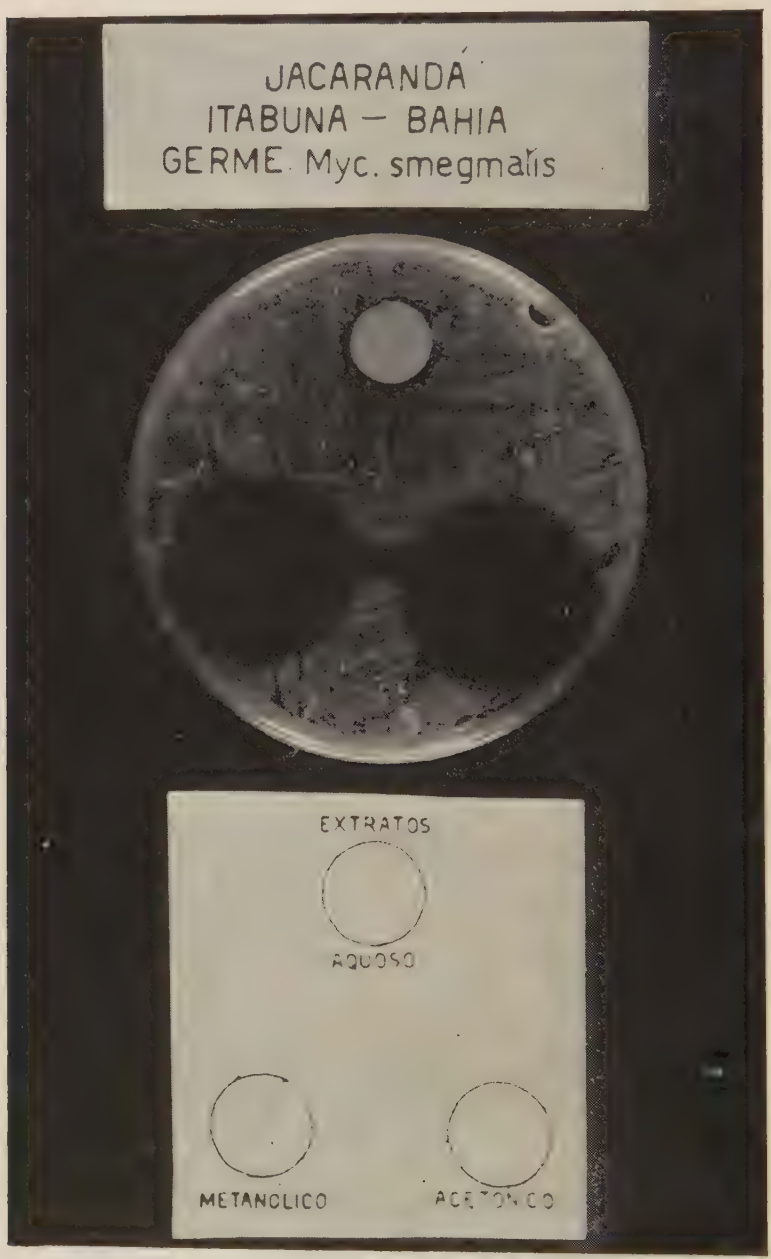

JACARANDÁ
ITABUNA — BAHIA
GERME Myc. smegmatis
EXTRATOS
AQUOSO
METANOLICO
ACETONICO

Fig. 11

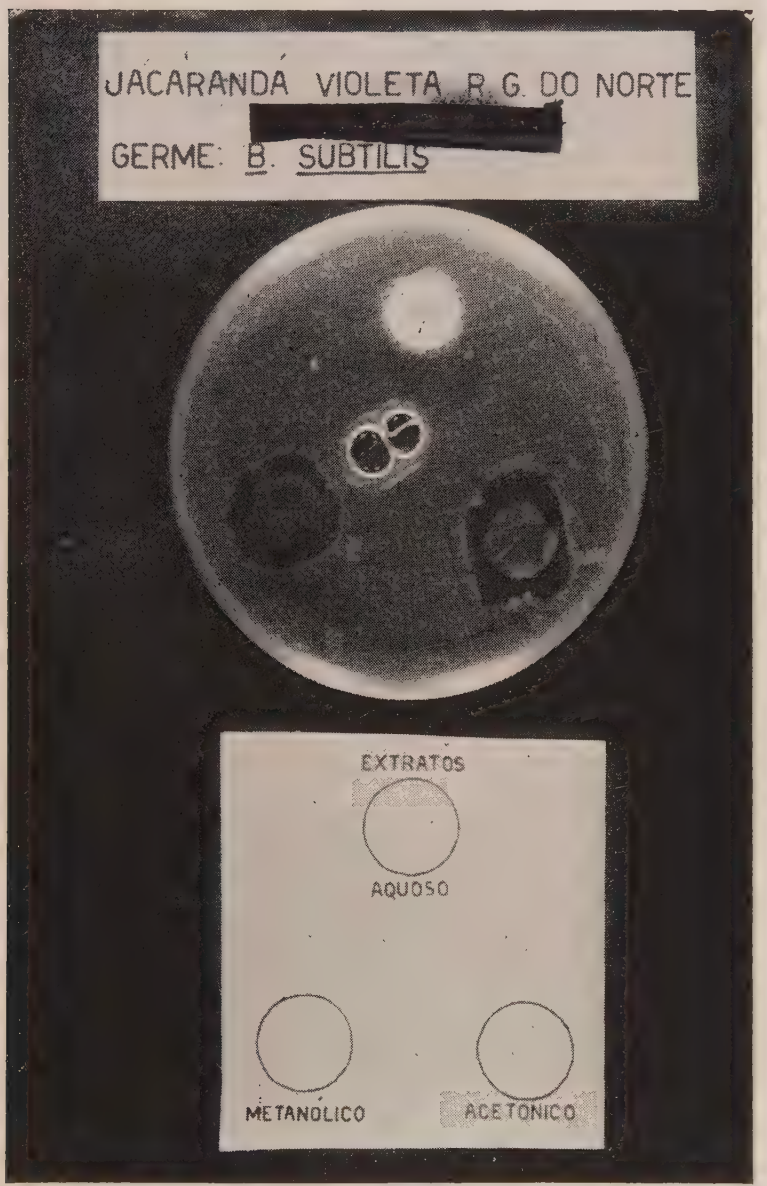

JACARANDÁ VIOLETA R. G. DO NORTE
[redacted]
GERME: B. SUBTILIS
EXTRATOS
AQUOSO
METANÓLICO
ACETÔNICO

Fig. 12

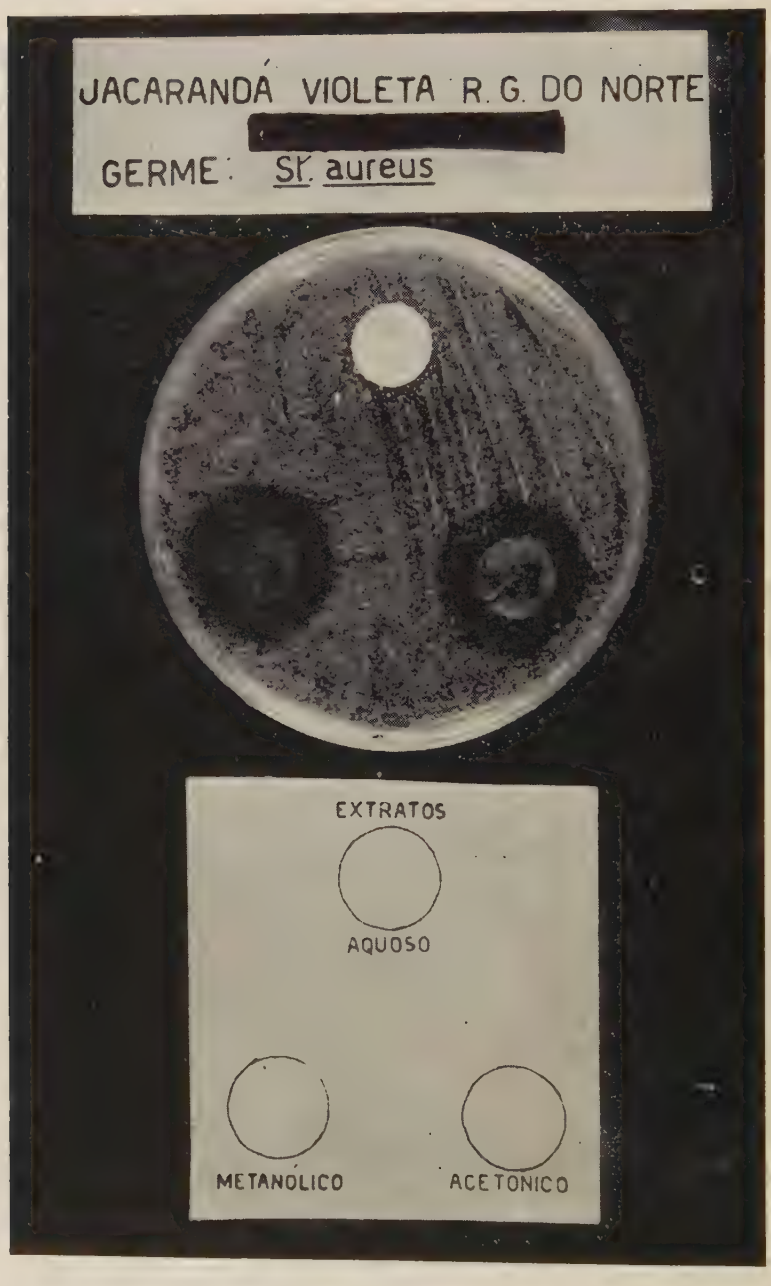

JACARANDÁ VIOLETA R. G. DO NORTE
[redacted]
GERME: St. aureus
EXTRATOS
AQUOSO
METANÓLICO
ACETÔNICO

Fig. 13

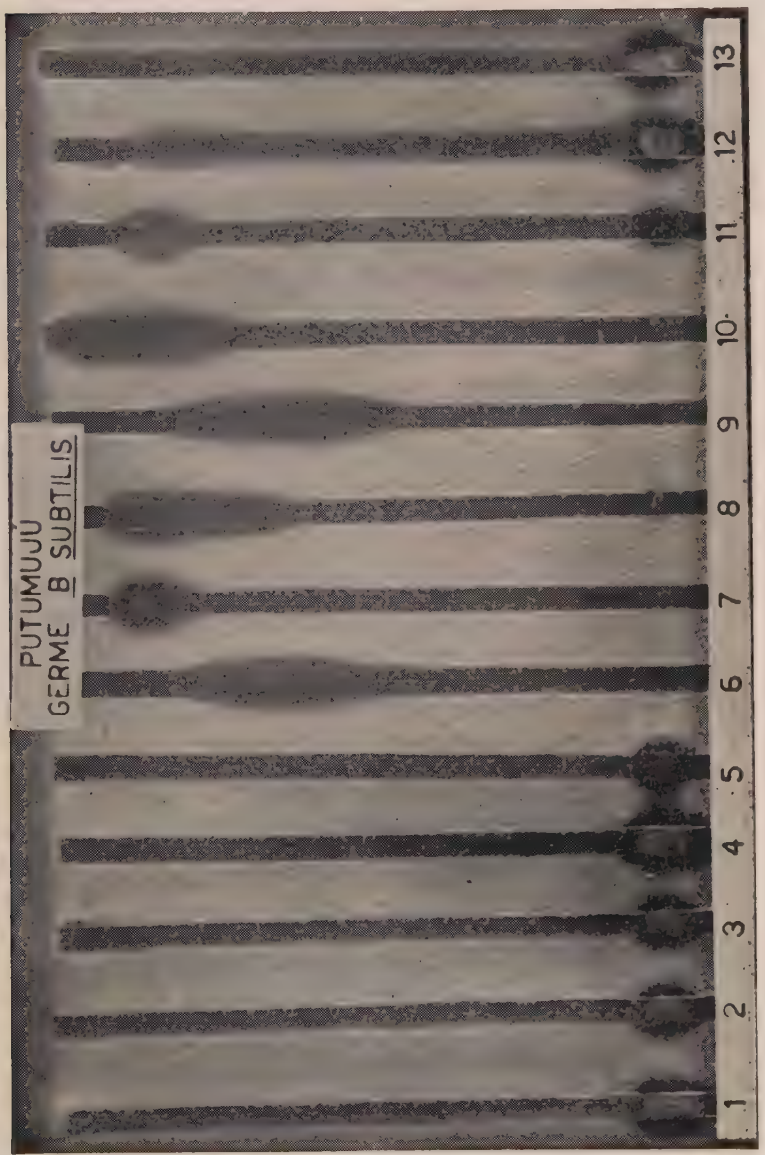


Fig. 14

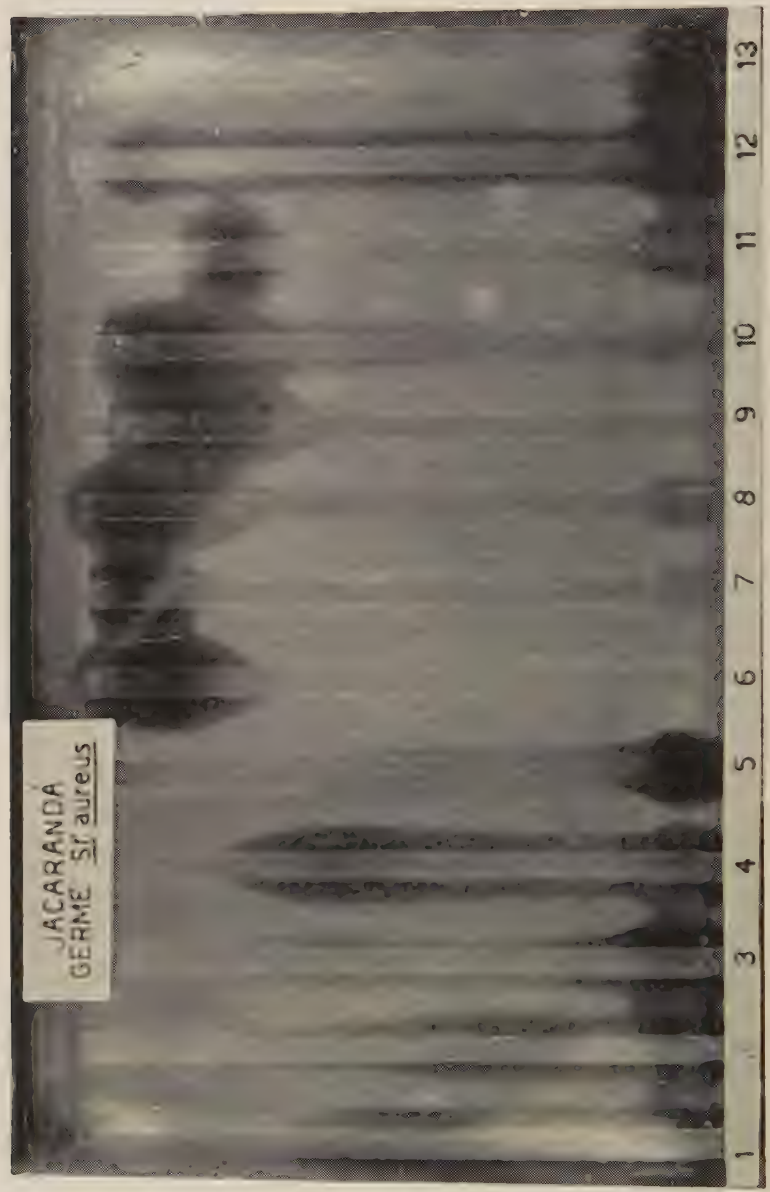


Fig. 15

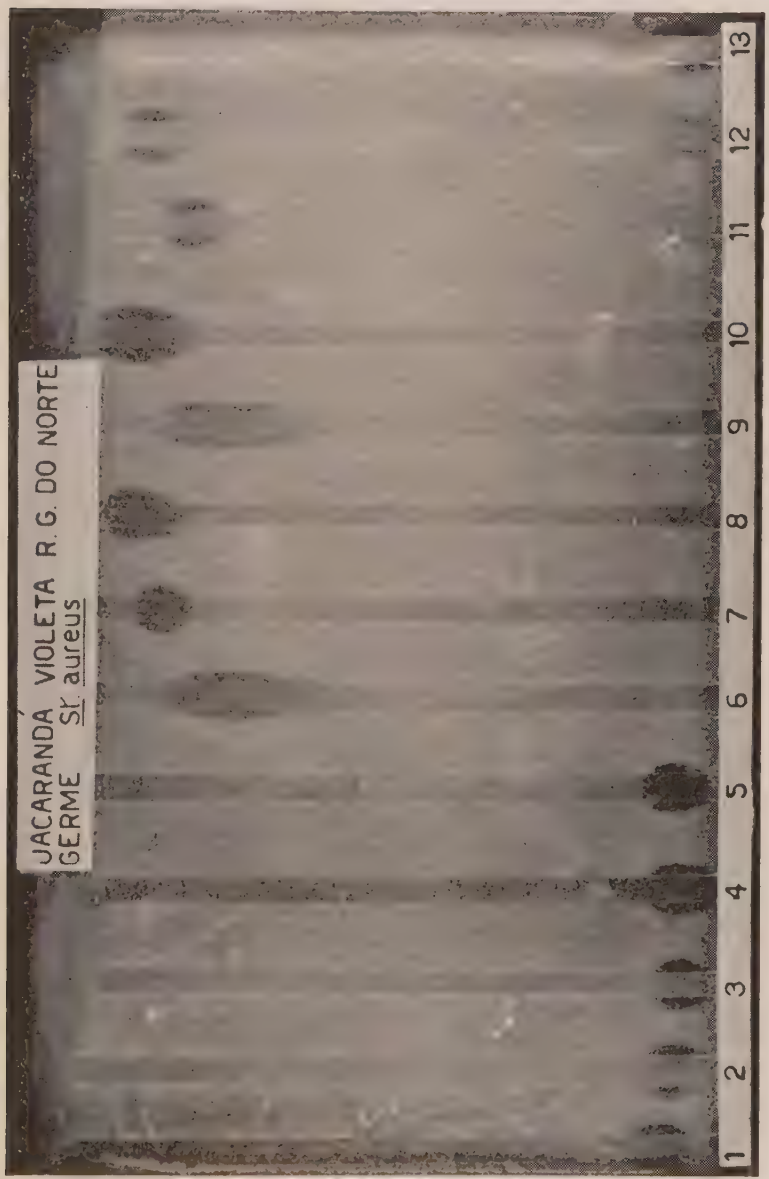

JACARANDA VIOLETA R.G. DO NORTE
GERME St. aureus
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

Fig. 16

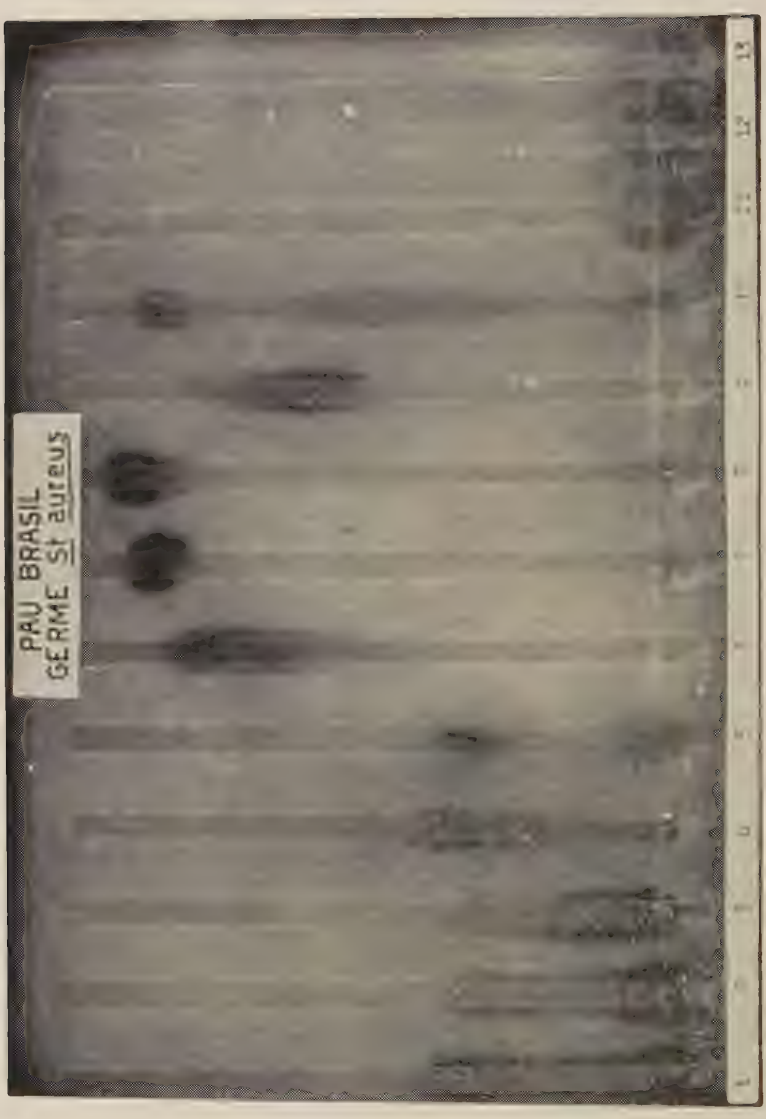


Fig. 17

Fig. 18

SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS DE PLANTAS SUPERIORES

Comunicação XV. Sôbre a ocorrência de antimicrobianos com ação contra *Candida spp.* em cascas do caule e de raízes de "Sabiazeira", *Miconia sp.* (*Melastomaceae*),

O. Gonçalves de Lima, Ivan L. d'Albuquerque, Marisa M. de Albuquerque e José Sidney B. Coêlho

No caso presente foi observado que os extratos etanólico e acetônico de cascas do caule e das raízes de u'a melastomácea muito comum nas matas dos arredores do Recife, denominada vulgarmente "Sabiazeira" (*Miconia sp.*) (fig. 1), ofereceram boa atividade contra *C. albicans*, em provas de discos de papel de filtro.

O primeiro fracionamento tentado consistiu em tratar por acetona o resíduo da evaporação do extrato etanólico, sendo a solução acetônica adicionada de éter de petróleo (p. eb. 30-60° C), até a precipitação da substância parda castanha, a qual quando sêca exibiu atividade contra *C. albicans* de cêrca de 100 mcg/ml. Comprovada a existência de bastante tanino na fração ativa, foi tentada a sua eliminação por tratamento da solução aquosa do resíduo acetônico por uma suspensão de gelatina, verificando-se no filtrado expoliação de grande parte da atividade original.

A ocorrência de tanino com marcada ação antimicrobiana já foi demonstrada anteriormente por Gavarron (1950) nas cascas de romã (*Punica granatum*), com atividade contra *B. anthracis, B. subtilis, S. schottmülleri, S. septemberg, B. melitensis, P. avicida, N. catarrhalis* e com débil ação contra *St. aureus* e *Str. pyogenes.*

FIG. 1

No nosso caso, considerando a possibilidade da presença de tanino ativo, foi tratado um extrato aquoso possuindo ação antimicrobiana, por uma solução de acetato de chumbo neutro, em excesso, submetendo-se o precipitado em suspensão aquosa — depois de abundantemente lavado — à ação de SH_2. O filtrado obtido após o ataque sulfídrico, apresentou mais de 70% da atividade original, permanecendo o restante no sobrenadante da precipitação de acetato de chumbo. A solução aquosa resultante do tratamento por acetato de chumbo e posteriormente por SH_2, foi evaporada a sêco, a vácuo, sendo tomado o resíduo por etanol absoluto. A solução obtida foi tratada por éter livre de peróxido, resultando na formação de abundante precipitado ativo contra *Candida albicans*, nas concentrações de 40 a 80 mcg/ml. Observou-se, ademais, que mesmo por uma exaustiva precipitação pelo éter, sempre permaneceu ativo o sobrenadante, cujo resíduo apresentou atividade de 70 mcg/ml contra *C. albicans*, com um espectro antimicrobiano constante do quadro I, no qual se pode notar a interessante sensibilidade demonstrada por *Str. hemolyticus* e *Dipl. pneumoniae*.

O comportamento das frações ativas, fazendo presumir a existência de mais de um antimicrobiano, uma delas contendo substâncias tânicas, nos levou a realizar algumas

papirografias, com sistemas adequados àquele grupo de substâncias, utilizando-se como revelador a solução aquosa de $(SO_4)_2FeNH_4.12\ OH_2$ a 0,2% (p:v), paralelamente à bioautografia por *C. albicans*.

Como material de prova usamos não sòmente o extrato total (acetônico ou etanólico), como precipitados obtidos por fracionamento da solução acetônica por benzeno (1.° e 2.° precipitados), e por tratamento do sobrenadante da precipitação com benzeno, com ligroína.

Usamos os sistemas:

1. Fenol saturado com água
2. n-butanol:ácido acético = 4:1; apenas saturado com água.
3. n-butanol saturado com NH_4OH concentrado
4. n-butanol:acetona:água = 5:1:2.

Os resultados logrados com os sistemas 2 e 4 são apresentados na fig. 2 e na fig. 3, nas quais se nota que as manchas — algumas das quais bem diversificadas — tomaram pelo reativo $(SO_4)_2FeNH_4.12\ OH_2$ a coloração azul ou azul violete, justamente os de Rf menores. Nos de valores Rf maiores, que se caracterizam por coloração violete-clara, parda e azul-cinza, não se constatou atividade, bioautogràficamente.

Segundo se pôde constatar pelo papirograma obtido pelo sistema 2 (fig. 2) usando o extrato total acetônico, há cinco (5) manchas ativas com reação azul e azul-violete ao reativo férrico, algumas das quais mal definidas, ademais de duas outras de Rf 0,78 e 0,95, inativas.

No segundo precipitado por benzeno, é de notar a ausência de manchas ativas com Rf inferiores a 0,33, o mesmo ocorrendo com a fração correspondente ao precipitado por ligroína, o que nos dá a noção do fracionamento realizado.

Na papirografia desenvolvida com o sistema 4, foi muito semelhante o comportamento das frações obtidas com benzeno (2.° precipitado) e com ligroína, notando-se em cada uma delas duas manchas ativas respectivamente de Rf 0,35 e 0,50 e 0,32 e 0,42, as quais ofereceram a reação colorida (azul) à solução férrica (fig. 3).

Diante dos resultados acima referidos, foi tentada uma separação cromatográfica em coluna de celulose em pó (Carl Schleicher n.° 123), utilizando-se a técnica de Schultz e Gmelin (1952) (*apud* Bramitzer, 1956) na elaboração da faixa de aplicação da substância problema, a qual se cons-

FIG. 2

Cromatograma do extrato acetônico e dos precipitados por benzeno e ligroina da "Sabiazeira". Desenvolvido com o sistema: n-butanol : ácido acético (4:1 v/v) água até saturação. Revelado por solução a 0,2% (p/v) de $(SO_4)_2FeNH_4.12\ OH_2$ e por *C. albicans* E.T.A. — extrato total acetônico: T — 2.º precipitado benzênico; T_1 — precipitado ligroínico

FIG. 3

Cromatograma dos precipitados por benzeno e ligroína de extrato acetônico da "Sabiazeira". Desenvolvido com o sistema n-butanol:acetona: água: (5:1:2 v/v) revelado por solução a 0,2% (p/v) de $(SO_4)_2FeNH_4.12\ OH_2$ e por *C. albicans*: T — 2.º precipitado benzênico: T, — precipitado ligroínico

tituiu da fração livre de clorofila obtida pela 1.ª precipitação da solução acetônica por benzeno.

O desenvolvimento foi descendente em coluna de 35 mm de diâmetro, por 310 mm de altura, usando-se o sistema 2 já referido. A eluição se procedeu nas faixas correspondentes a Rf de valores intermediários e inferiores, os primeiros com atividades oscilando entre 100-150 mcg/ml, e os segundos atingindo 60-80 mcg/ml para *C. albicans*.

Operando diretamente com extrato bruto acetônico, segundo o mesmo método anterior de cromatografia em coluna de celulose, porém ascendente, conseguimos obter quatro frações, duas das quais, que migraram mais velozmente, (3.ª e 4.ª), não ofereceram atividade apreciável, enquanto as duas outras com valores Rf correspondentes a 0,04 — 0,17 e 0,33 — 0,48, apresentaram atividade de 40-60 mcg/ml contra *C. albicans*.

QUADRO I

Espectro antimicrobiano da fração imprecipitável pelo éter
Concentrações mínimas de inibição (mcg/ml)

MICROORGANISMO	mcg/ml
B. subtilis 9	> 100,0
St. aureus	> 100,0
E. coli R	> 100,0
Shigella paradysenteriae	> 100,0
Str. hemolyticus	15,0 — 20,0 (48 h — 40-50)
Brucella suis	50,0 — 60,0
Nocardia asteroides	> 100,0
Myc. smegmatis	80 — 100
Myc. phlei	20,0 — 40,0
Myc. tuberculosis v. *hom.*	80 — 100
C. albicans	60,0 — 80,0
C. krusei	80,0 — 100,0
C. stellatoidea	60,0 — 80,0
C. tropicalis	80,0 — 100,0
Cr. neoformans	> 100,0
Diplococcus pneumoniae	20 — 40

Das frações referidas, sòmente o eluato 1 (Rf 0,04 — 0,17) apresentou reação positiva para o reativo férrico (clo-

reto de ferro (III) a 5%), com precipitado de coloração azul pura. Do mesmo modo, foi positivo o seu comportamento para outros reativos dos taninos, tais como gelatina (0,5%), acetato de chumbo neutro (5%) e o reativo de hexametilenotetramina (Gnamm, 1949).

Quanto à fração que se lhe seguiu, o eluato 2, o qual se mostrou com idêntica atividade contra *Candida*, apenas ofereceu turvação (efeito Tyndall) com o reativo de hexametilenotetramina e com o reativo plúmbico.

Em relação à estabilidade das duas frações (1 e 2) tivemos oportunidade de verificar que a primeira (portadora das reações gerais dos taninos) sofreu inativação depois de 2 meses à temperatura de 6º-12º C. Quanto à segunda, sob as mesmas condições, apresentou atividade muito próxima da originária, em relação a *C. albicans*, conforme se vê no quadro II.

QUADRO II

Atividade antimicrobiana da fração 2 da cromatografia em coluna de celulose
Concentração mínima de inibição (mcg/ml)

MICROORGANISMO	mcg/ml
C. albicans	50 — 60
Dipl. pneumoniae	40 — 50
Brucella suis	60 — 80
Str. hemolyticus	20 — 40

DISCUSSÃO

É evidente que na espécie estudada (*Miconia sp.*) há substâncias ativas que se distinguem perfeitamente por papirografia, algumas das quais apresentando comportamento tanóide, como foi demonstrado por sua conduta química (reativos de coloração e precipitação), e ainda comprovado pelo seu comportamento frente ao método de isolamento através da precipitação por acetato de chumbo e fracionamento pelo éter, de sua solução etanólica.

Como foi notado, as substâncias ativas com positividade para o reativo férrico parece que são em sua maioria de

estruturas muito próximas, havendo contudo algumas com razões de migração cromatográfica bem distintas.

O fracionamento logrado por via papirográfica e pelo método de Schultz & Gmelin, tanto por revelação química (reativo $(SO_4)_2FeNH_4.12OH_2$), como bioautográfica, vem demonstrar, ao nosso entender, que o estudo dêsse grupo de substâncias tânicas pode agora apresentar um novo interêsse fitoquímico.

A propósito da importância que o estudo dos antimicrobianos pode oferecer, também na contribuição fitoquímica à taxonomia, queremos aqui referir o fato de que substâncias com comportamento muito similar à da *Miconia sp* foram por nós constatadas em outra melastomácea de nome vulgar "manipueira" (*Henrietta sp.*), pelo método de cromatograma sumário de Ishida, modificado por um de nós (Gonçalves de Lima, 1959).

SUMMARY

This paper deals with a chromatographic research on antibiotic activity of extracts from a plant (*Miconia sp.*) (*Melastomaceae*) very common in the woods near the city of Recife (Pernambuco).

In the course of the survey of the chemical properties of the fractions with antibiotic activity against *Candida albicans* it was observed taninlike behaviour. In the same plant it was accomplished the existence of active more stable substance without reactions of tanin, with action against fungi and bacteria species.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verfasser legen die vorlaeufigen Ergebnisse einer chromatographischen Untersuchung vor welche mit den antimikrobiell aktiven Auszuegen einer *Melastomaceae* durchgefuehrt wurde; genannte Pflanze gedeiht in den Waeldern von Pernambuco (*Miconia sp*).

Sie beobachteten dabei, dass Substanzen die sich wie Gerbstoffe verhalten, eine Hemmwirkung gegen *Candida albicans* aufzeigten. Eine andere Substanz, noch bestaendiger als die Gerbstoff-Fraktionen und mit aehnlicher Wirkung wurde aus derselben Pflanze freigelegt.

RESUMÉ

Les auters présentent les résultats preliminaires d'une

investigation cromatographique réalisée avec des extracts actifs antimicrobiens d'une *Melastomaceae* existant dans les bois de Pernambuco (*Miconia sp.*).

Ils ont observé, que substances que se comportent comme des tanins, présentent une inhibition, vers *Candida albicans*. Une autre substance active, plus estable que les fractions tanniques, avec action semblable fût decellé dans la même plante.

REFERÈNCIAS

BLOCK ,R. J. *et al.* — Paper Chromatography and Paper Electrophoresis. Second Edition. Academic Press — Publishers — New York (1958).

BRAUNITZER, G. — Die Chromatographische Analyse in Saeulen *in* Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, K PAECH & M. V. TRACEY. Springer-Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg, I Bd., S. 95. (1956)

GAVARRON, F. F., Propriedades Antibióticas del ácido tanico obtenido de la cascara de granada (*Punica granatum*) *Ciencia 9-10*: 285 (1950).

GNAMM, H. — Die Gerbstoffe und Gerbmittel, 3. Aufl. Stuttgart, 56 (1949) *apud* Otto Th. Schmidt Natürliche Gerbstoffe *in PAECH* K. und N. V. I. TRACEY Mod. Meth d. Pflanzenanal. Bd. *III*, 5, 6 (1955).

GONÇALVES DE LIMA, O. — Comunicação à Sociedade de Biologia de Pernambuco em Sessão de 25 de setembro de 1959.

S. ERYTHROGRISEUS: NOVO STREPTOMYCES PRODUTOR DE ANTIBIÓTICO

J. O. Falcão de Morais e Maria Helena Dália Maia

São estudadas duas amostras de *Streptomyces* (1172 e 1173) ativas contra Gram-positivos, *Mycobacteria* e *Candida albicans* e produtoras de um novo antibiótico (Erigrisina). Assemelham-se ao *S. erythraeus* dêle diferindo principalmente por terem o micélio aéreo cinza-marrom avermelhado (o do *S. erythraeus* é branco). Os autores consideram essas cêpas como pertencentes a uma nova espécie a que denominam *Streptomyces erythrogriseus*.

Durante nossos trabalhos de pesquisas de novos antibióticos de actinomicetos foram isoladas, de solo proveniente do município de Olinda, Estado de Pernambuco, duas amostras de *Streptomyces* (1172 e 1173) as quais ao serem submetidas a provas de estrias cruzadas revelaram forte ação contra bactérias Gram-positivas, sendo também bastante ativas contra *Mycobacteria* e *Candida albicans*. Essas duas cêpas produzem em meios líquidos uma substância antibiótica (Erigrisina) com atividade *in vitro* contra várias bactérias (Andrade Lyra *et al.*, 1959).

O estudo taxonômico dos *Streptomyces* 1172 e 1173 levou-nos à conclusão de que são cêpas da mesma espécie; êles se incluem no grupo do *S. ruber*, têm muito de comum com *S. erythraeus*, dêste se distinguindo principalmente pela coloração do micélio aéreo esporulado, o qual no *S. erythraeus* é branco (Breed, R. S. *et al.*, Bergey's Manual, 1957; Krassilnikov, N. A., 1949; Waksman, S. A. & Lechevalier, H. A., 1953) e nas amostras aqui consideradas é cinza, recobrindo-se, após 15 dias, de uma coloração vermelha-marrom.

Recebido para publicação a 31 de dezembro de 1959.

Não encontrando os autores na literatura especializada uma espécie descrita que enquadre as características das amostras estudadas — principalmente a coloração do micélio aéreo esporulado —, consideram as mesmas como de uma nova espécie à qual denominam *Streptomyces erythrogriseus*.

Streptomyces erythrogriseus Morais & D. Maia, n. sp.

Morfologia — Os esporóforos formam espirais longas e abertas (Secção *Spira*, segundo Pridham *et al.*, 1958) Esporos globosos a elípticos.

Micélio aéreo esporulado — Inicialmente é cinza, passando, entre 15 e 30 dias a se recobrir de uma coloração que lembra ferrugem; esta coloração de início é rosa (4 F 9) passando com o envelhecimento a vermelho-marrom (6 C 10) (Maerz & Paul, Dictionary of Color, 1950).

Desenvolvimento vegetativo — Em alguns meios: Czapek, Asparagina-glicose, Extrato de levedura-extrato de malte (Meio L), nos primeiros dias de cultivo é laranja-violáceo; com o envelhecimento adquire uma coloração marrom-chocolate, mostrando quase sempre em tôrno de 15 dias um tom violáceo. Nos meios complexos, como agar-nutritivo, o desenvolvimento vegetativo é creme a marrom.

Pigmento solúvel — Nos meios complexos proteinados (gelatina-peptona; leite) não há formação de pigmento solúvel marrom; nos substratos sintéticos ou semi-sintéticos açucarados, onde o micélio vegetativo é corado (vermelho-violáceo-alaranjado) êsse pigmento aos poucos difunde-se no substrato, apesar de não ser extraído por água. (A extração com etanol se faz com facilidade, obtendo-se uma solução vermelha, que passa a amarela pela adição de ácido e a laranja pela junção de uma base).

Agar-Czapek — Desenvolvimento vegetativo marrom aos 30 dias; micélio aéreo abundante, cinza, chegando aos 30 dias a se recobrir de uma coloração vermelha-marrom. Reverso vermelho-violáceo com o envelhecimento. Após um mês o pigmento avermelhado empresta uma débil coloração ao meio.

Extrato de levedura-extrato de malte (Meio L) — Como em Czapek.

Glicose-agar — Micélio aéreo cinza-ferrugem; pigmento solúvel marrom-vermelho; reverso chocolate.

Amido-agar — Micélio aéreo cinza-escuro; reverso vermelho-arroxeado; pigmento solúvel laranja-claro. Hidrólise positiva (10 mm de halo aos 10 dias).

Batata — Desenvolvimento vegetativo amarelo-esverdeado a alaranjado; recobre-se logo com um micélio aéreo cinza que passa depois a vermelho-ferrugem. A batata se torna marrom-violácea.

Gelatina — Liquefação rápida (geralmente é completa entre 7 e 15 dias); Leve pigmentação rosa-alaranjada solúvel.

Leite — Peptonização rápida (total entre 7 e 15 dias). Desenvolvimento incolor.

Celulose — Crescimento positivo.

Nitrito — Fracamente produzido de nitrato (meio: amido-nitrato).

Assimilação de carbono — (Meio básico de Pridham & Gottlieb adicionado de 1% do composto a testar; inóculo de esporos com alça) — Resultado positivo com citrato de sódio (crescimento fraco), salicina, xilose, manitol, lactose, ramnose e sacarose. Rafinose não é utilizada.

Quadro 1 — Principais caracteres distintivos entre *S. erythrogriseus* e *S. erythraeus*.

MEIO	S. erythrogriseus	S. erythraeus (Bergey's Manual, 1957)
Agar sintético	Desenvolvimento vegetativo laranja violáceo a marrom. Micélio aéreo-cinza, recobrindo-se depois com uma coloração vermelha-marrom.	Desenvolvimento vegetativo de início branco, passando a amarelado. Micélio aéreo branco.
Amido-agar	Micélio aéreo cinza-escuro; reverso vermelho-violáceo. Pigmento solúvel laranja-claro	Colônias cremes, circulares, com débil coloração esverdeada.
Batata	Desenvolvimento vegetativo amarelo-esverdeado a alaranjado; recobre-se logo com um micélio aéreo cinza que passa depois a vermelho-ferrugem. A batata se torna marrom-violácea.	Desenvolvimento vegetativo creme, tornando-se amarelo (Bergey's Manual). Segundo nossas observações (S. erythraeus ATCC 11635) a cultura apresenta aos 20 dias um micélio aéreo branco que permanece branco mesmo após 2 meses.

NOTA — *Actinomyces ferrugineus* (Naunyn) n. comb. Syn.: *Nocardia ferruginea* Toni & Trevisan, 1889, pela descrição de Krassilnikov (1949) afasta-se marcadamente de *S. erythrogriseus*.

Antagonismo — Ativo em estrias cruzadas contra Gram-positivos, ácido-resistentes e *Candida albicans*; pràticamente inativo contra Gram-negativos. Produz um antibiótico (erigrisina) ativo contra várias bactérias, especialmente Gram-positivas.

SUMMARY

Two strains of *Streptomyces* (ns. 1172 and 1173) were isolated which have a strong antagonistic action against Gram-positive bacteria, *Mycobacteria* and *Candida albicans*.

They resemble *S. erythraeus* (*S. ruber* group) but differ mainly in the color of the sporulated aereal mycelium (it is initially gray and after 15 days is recovered with a red-brown pigment; *S. erythraeus* has the aereal mycelium white).

These strains produce a probably new antibiotic substance named Erygrisin, active against several bacteria.

The authors designate these strains as *Streptomyces erythrogriseus* N. Sp.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden zwei *Streptomyces* (N.° 1172 und 1173) mit starker antagonistischer Wirksamkeit gegen grampositive Bakterien, *Mycobacterium* und gegen *Candida albicans* isoliert. Das taxonomische Studium zeigte, dass beide *Streptomyces* einer Art angehoeren, welche an *S. erythraeus* (Gruppe des *S. ruber* erinnert. Von diesen unterscheiden sie sich hauptsaechlich durch die Faerbung des sporenartigen Luftmycels (anfaenglich grau und nimmt spaeter nach 15 Tagen eine rotbraune Faerbung an; beim *S. erythraeus* gibt es eine weisse Faerbung). Diese Staemme erzeugen eine wahrscheinlich neue antibiotische Substanz (Erygrisin) aktiv gegen verschiedene Bakterien, dies hauptsaechlich gegen Grampositive.

Die Verfasser schaetzen diese *Streptomyces* als zu einer neuen Art angehoerend ein und bezeichnen sie als *S. erythrogriseus*, N. sp.

REFERÊNCIAS

ANDRADE LYRA, F. D., ALBUQUERQUE, M. F., GONÇALVES DE LIMA, O., FALCÃO DE MORAIS, J. O. & BISPO, M. S. 1959. Erigrisina — Um antibiótico produzido por *Streptomyces* (*S. erythrogriseus* Morais

& D. Maia). Rev. Antib. Univ. Recife. *2*, ns. 1 e 2, 99-107.

BREED, R. S., E. G. D. MURRAY, N. R. SMITH. 1957. Bergey's Manual of Determinatiive Bacteriology. The Williams & Wilkins Co.

KRASSILNIKOV. N. A. 1949. Guide to the identification of bacteria and actinomycetes. Acad. Sci. USSR, Moskow. (J. B. Routien, USA).

MAERZ, A. & M. REA PAUL. 1950. A Dictionary of Color. McGraw — Hill Co.

WAKSMAN, S. A. & H. A. LECHEVALIER. 1953. Acinomycetes and their antibiotics. The Williams & Wilkins Co.

NOVOS DADOS SÔBRE A *URENSINA* (*), COMPLEXO ANTIBIÓTICO ISOLADO DA CÓRTEX RADICULAR DE *"CNIDOSCOLUS URENS"* (L) EUPHORBIACEAE

Evans Silva, Lizete Lins de Oliveira, Myrtes da Silveira Bispo e Francisco Décio de Andrade Lyra

São apresentados novos dados biológicos sôbre a Urensina (complexo antibiótico isolado da cortex radicular de *"Cnidoscolus urens"* (L) Arthur (Euphorbiaceae) referido em trabalho anterior (*Rev. Inst. Antib. Univ. Recife, 1:* 125-29, 1958).

Em um trabalho anterior sôbre a ocorrência de substâncias antitumorais em plantas superiores (Silva, Lima e Albuquerque, 1958) foram apresentados os primeiros resultados químicos e biológicos, obtidos com uma substância de caráter flavonóide e atividade antibiótica isolada da córtex radicular de *"Cnidoscolus urens"* (L) EUPHORBIACEAE.

No presente trabalho são relatados alguns novos resultados obtidos com a continuação dos estudos sôbre a referida substância.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

De início resolvemos verificar se a atividade antimicrobiana da Urensina conservada em câmara fria a 4º C. durante 8 meses, havia sofrido alteração.

O resultado obtido nesta verificação comparado com o resultado obtido e publicado anteriormente mostrou-se con-

(*) — Nome proposto ao complexo antibiótico isolado da córtex radicular de *"Cnidoscolus urens"* (L) ,Euphorbiaceae, e apresentado em *Rev. Inst. Antib. Univ. Recife., 1:* 125-29, 1958.

traditório em virtude da maior atividade apresentada pela substância após um estágio de 8 meses em câmara fria a 4º C.

Visando esclarecer o paradoxo citado acima, fizemos uma nova extração seguindo pormenorizadamente a técnica publicada anteriormente, os dados obtidos sendo expressos juntamente com os acima referidos no Quadro I.

QUADRO I

Concentrações mínimas de inibição (ug./ml.) de Urensina bruta

Microorganismo	Results. publicados em trabalho anterior	Results. atuais com Urensina armazenada 8 mêses a 4º C.	Results. obtidos com a Urensina extraída recentemente
B. subtilis 9	90	40-45	40-45
S. aureus W	25	15-20	15-20

Os resultados expressos no Quadro I, permitem-nos concluir:

1.º A atividade da Urensina publicada no trabalho anterior não expressa a atividade real da substância.

2.º A Urensina não sofre alteração em sua atividade antimicrobiana quando armazenada em câmara fria a 4º C. durante 8 meses.

Investigações sôbre o que motivou a discrepância dos resultados obtidos nos trabalhos atual e anterior, fizeram-nos chegar a seguinte conclusão: provàvelmente, em virtude da Urensina ser um complexo volátil o fato de guardá-la em dessecador a vácuo cêrca de 6 horas após a pesagem calculada para as diluições a serem testadas, fazia com que a substância perdesse cêrca de 50% do pêso, o que motivava a fraca atividade antimicrobiana aparente, apresentada no trabalho anterior.

BIOCROMATOGRAMA SUMÁRIO

Visando esclarecer a quantidade e característica dos componentes químicos que constituem a Urensina, adotamos

o processo cromatográfico sumário de Ishida *et al.* (1951, 1952) modificado por Sevcik (1959) com a 1.ª modificação de O. Gonçalves de Lima (1959) constante da adição de mais 3 solventes aos 10 já propostos por Sevcik e destinado a obter um melhor ajustamento à pesquisa de antimicrobianos obtidos de plantas superiores.

O processo constou de uma papirografia sumária em tiras de papel Whatman n.º 1, de 17 por 1 cm. desenvolvida em tubos de aproximadamente 18 por 4 cms. com a série eluotrópica de Sevcik (1959) adicionada de mais 3 solventes (O. Gonçalves de Lima, 1959) num total de 13 tubos assim discriminados (Quadro II).

QUADRO II

Solventes e tubos numerados correspondentes, utilizados no biocromatograma citado no texto

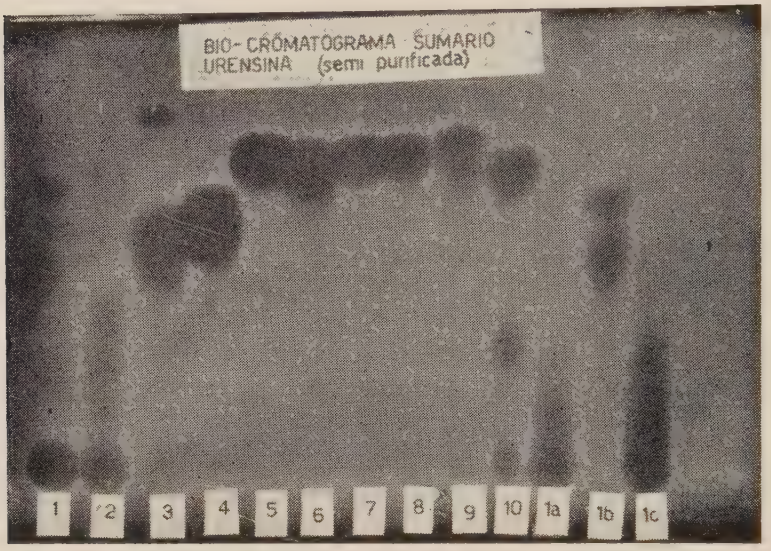
TUBOS	SOLVENTES
1	Água destilada
2	Cloreto de amônia a 3%
3	Metanol a 96%
4	Acetona
5	Acetato de etila (saturado com água)
6	n-Butanol (saturado com água)
7	Éter etílico (saturado com água)
8	Clorofórmio
9	Benzeno
10	Éter de petróleo
(**) 1a	HCl (N/100)
(**) 1b	HONa (N/100)
(**) 1c	Sol. saturada de ácido pícrico

(**) — Solventes adicionados de acôrdo com a 1.ª modificação de Lima (1956).

A revelação bioautográfica feita com *S. aureus* (Fotografia I) comparada com os dados obtidos com o biocromatograma sumário mostra-nos a Urensina composta de pelo menos 4 manchas coloridas, sendo 3 ativas e 1 inativa.

A mancha inativa foi evidenciada no cromatograma pelos solventes 2, 7, 9, 1a e 1b.

As 3 manchas ativas foram demonstradas pela bioautografia do cromatograma obtido com éter de petróleo.



Fotografia I — Biocromatograma sumário da Urensina
Microorganismo — S. aureus
Solventes — em correspondência numérica com o Quadro II

QUADRO III

Resultado final do Biocromatograma sumário, descrito no texto

TUBOS	MANCHAS		
	n.º total	n.º ativas	n.º inativas
1	2	2	—
2	2	1	1
3	2	2	—
4	1	1	—
5	1	1	—
6	1	1	—
7	2	1	1
8	1	1	—
9	2	1	1
10	3	3	—
1a	2	1	1
1b	3	2	1
1c	2	2	—

TOXIDEZ

Novos testes de toxidez em continuação aos relatados no trabalho anterior foram realizados em ratos Wistar, por via intraperitoneal utilizando-se suspensões de Urensina com sôro fisiológico e Tween 80 levadas a pH. 7.0.

Os resultados encontram-se no Quadro IV.

QUADRO IV

Toxidez da Urensina em ratos Wistar por via intraperitoneal

Dose mg./kg	N.º de animais	N.º de injeções de 24/24 h.	Sobreviventes	Mortos
300	3	1	0	3
200	3	2	0	3
100	3	2	0	3

SUMMARY

The AA. report new observations about Urensin (a new antibiotic complex of flavonoid structure from the cortex of "Cnidoscolus urens" (L) Arthur (Euphorbiaceae), (*Rev. Inst. Antib. Univ. Recife., 1*: 125-29, 1958).

a) The real antibiotic activity is twice the activity reported in the anterior paper. A explanation of the probable cause of this difference is presented.

b) Urensin does not lose its activity staying for 8 month at 4º C, not even partially.

c) Urensin when submitted to the summary biochromatogram of Ishida modified by Sevcik and later by Gonçalves de Lima, presented 4 colored stains, 3 which were active.

d) New data of toxicity by intraperitoneal route in rats are presented.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verfasser berichten ueber neue Einzelheiten welche das Urensin, (vorgeschlagener Name des antibiotischen Komplexes Flavonaehnlicher Struktur der aus den Wurzelfasern der "*Cnidoscolus urens*" (L) Arthur (*Euphorbiaceae*) erhal-

ten wurde behandeln. In voriger Arbeit erschienen in der *Rev. Inst. Antib. Univ. Recife.*, 1: 125-29, 1958. (Zeitschrift des Antibiotischen Institutes).

a) Die wirkliche antibiotische Taetigkeit des Urensins ist praktisch das Doppelte als der vorher berichteten. Eine Erklaerung der wahrscheinlichen Ursache ist im Text vorgelegt.

b) Das Urensin vorlor nicht, auch nicht teilweise eine antimikrobielle Wirksamkeit durch Aufbewahrung waehrend 8 Monaten im Eisschrank bei 4º C.

c) Wenn das Urensin dem Sammel-Bichromatogramm von Ishida unterworfen wird, welches von Sevcik abgeaendert wurde und spaeter eine nochmalige Aenderung durch Gonçalves de Lima erlitt, zeigte 4 gefaerbte Flecken, 3 davon sind aktiv.

d) Neue Toxitaetsangaben bei inter-peritonealer Verabreichung an Ratten werden vorgelegt.

RESUMÉ

Les auteurs relatent de noveaux resultats sur l'Urensine (nom proposé au complexe antibiotique de constitution flavanoide obtenu à partie de l'ecorce radiculaire du "Cnidoscolus urens" (L) Arthur (Euphorbiaceae) cité dans un travail antérieur (*Rev. Inst. Antib. Univ. Recife*, 1: 125-29, 1958).

a) L'activité antibiotique réelle de l'Urensine est pratiquement double de celle relatée antérieurement. Une explication de la cause probable de cette différence est présentée dans le texte.

b) L'Urensine conservée pendant 8 mois en chambre froide à 4º C n'as pas perdu son activité antimicrobiene même partiellement.

c) L'Urensine quand elle est soumise au biochromatogramme sommaire d'Ishida modifié par Sevcik et postérieurement par Gonçalves de Lima a présenté 4 taches colorées, dont 3 actives.

d) De nouveaux resultats sur la toxicité par voie intrapéritonéale sur des rats, sont présentés.

REFERÊNCIAS

GONÇALVES DE LIMA, O., *Comunicação à Sociedade de Biologia de Pernambuco*, em sessão de 25 de Setembro de 1959.

N. ISHIDA, T. SHIRATARI, S. OKAMOTO, G. MIYAZAKI. 1951. *J. Antibiotics* (Jap.) *4;* 505.

N. ISHIDA, MIYAZAKI, 1952. *J. Antibiotics* (Jap.) 5: 481.

SEVCIK, V., *Conferência pronunciada no I.A.U.R.* em 26 de agôsto de 1959.

SILVA, E; GONÇALVES DE LIMA, O; ALBUQUERQUE, M. M. 1958. *Rev. Inst. Antib. Univ. Recife. 1:* 125-29.

OBSERVAÇÕES SÔBRE A UTILIZAÇÃO DE *ZYMOMONAS MOBILIS* (LINDNER) KLUYVER & VAN NIEL, 1936. (*TERMOBACTERIUM MOBILE*, LINDNER, 1928; *PSEUDOMONAS LINDNERI* KLUYVER & HOPPENBROUWERS, 1931), NA TERAPÊUTICA HUMANA

Aristides de Paula Gomes

(Médico Higienista do Departamento de Saúde Pública de Pernambuco)

São relatadas observações sôbre a ação da *Zymomonas mobilis* em um caso de cistite crônica com exacerbações periódicas e 6 casos de enterocolite crônica.

INTRODUÇÃO

A *Zymomonas mobilis* é o nome atual de um microrganismo isolado por Paul Lindner em 1924 quando estudava a flora bacteriana do "pulque", bebida tìpicamente mexicana, conhecida desde os tempos pré-Cortezianos e utilizada pelos indígenas em ritos religiosos e sacrificiais. Foi reisolado posteriormente por Gonçalves de Lima em 1950.

Referências às propriedades medicinais do "pulque" foram feitas por Hernandez (1780); Clavigero (1807); Dolley (1911); Lindner (1929 e 1939).

O presente trabalho relata os resultados terapêuticos observados com a administração de culturas líquidas de *Zymomonas mobilis* fornecidas pela Secção de Microbiologia do Instituto de Antibióticos da Universidade do Recife, a 6 pacientes portadores de entero-colites crônicas de etiologia indefinida e um portador de cistite crônica com crises agudas periódicas.

MÉTODOS E OBSERVAÇÕES

A cultura líquida utilizada, foi obtida por semeadura

de *Zymomonas mobilis* em meio de Schreder modificado (PO_4HK_2, 1 g; $SO_4(NH_4)_2$, 1 g; Sacarose, 20 g; $SO_4Mg.\ 7H_2O$, 0,5 g; ext. de levedura Difco, 1 g; água potável, 1 litro) e utilizada 48 horas depois de incubação à temperatura ambiente.

Foi administrada por via oral num total de 300 ml diários divididos em 3 doses antes das refeições.

Caso 1 —

M.J.F.M. — menor com 1 ano e 4 meses de idade, portadora de diarréia crônica a 8 meses, precedida de episódio disentérico acompanhado de vômitos. Fêz uso de antibióticos e quimioterápicos sem resultado; apresenta-se ao exame bastante desnutrida e com dores abdominais generalizadas.

Resultados — Após o uso da cultura líquida de *Zymomonas mobilis* apresentou-se com aspecto normal e sem a síndrome diarréica antes relatada.

Caso 2 —

M.D.E. — sexo masculino, 40 anos de idade. Há mais de 8 anos queixa-se de distúrbios intestinais com constipação e diarréia alternada. Também acusa dores espontâneas no lado esquerdo do abdômen. Dejeções recobertas de muco; cólons e alças delgadas doloridas à palpação. Alça sigmóide dolorida e espástica. Exames copro-parasitológicos negativos.

Resultados — Melhoria acentuada após alguns dias de uso da cultura líquida de *Zymomonas mobilis*.

Caso 3 —

M.J.P. — sexo feminino, 40 anos de idade. Refere sofrer há muito de distúrbios intestinais. Já fêz tratamento para Tricocéfalos e Áscaris. Queixa-se de dores intestinais, cefaléia occipital intensa, diarréia e eructações freqüentes.

À apalpação, abdômen depressível com dôres ao nível dos cólons e principalmente na alça sigmóide. Discreto timpanismo no flanco e fossa ilíaca direitos.

Resultados — Desaparecimento completo das dores abdominais e da diarréia. Melhoria acentuada do estado geral.

Caso 4 —

N.R. — sexo masculino de 27 de idade. Refere haver

sido tratado de Esquistossomose com exame coprológico e biópsia retal atualmente negativos. Continua no entanto a sofrer de dores intestinais e de sensação de pêso na região gástrica. Ligeiro timpanismo em todo o abdômen, dores generalizadas abdominais, à palpação; fígado sensível.

Resultados — Após o tratamento desaparecimento completo dos sintomas.

Caso 5 —

N.T.A. — Sexo feminino, 33 anos de idade. Queixa-se de crises diarréicas alternadas com constipação. Exame coprológico positivo para *E. hystolytica.*

Resultados — Desaparecimento completo dos sintomas.

Caso 6 —

A.M. — Sexo feminino, 60 anos de idade. Queixa-se de diarréia constante com muco. Exame coprológico negativo. Estado geral deficiente. Ao exame, alças delgadas muito doloridas à palpação; alça sigmóide espástica e dolorida. Fígado aumentado e sensível à palpação.

Resultados — Apreciável melhoria da síndrome dispéptica e do estado geral.

Caso 7 —

T.A. — Sexo masculino, 45 anos de idade. Queixa-se de periódicas crises de cistite com hipertermia (39.5º C.) durante 3 a 4 dias em cada crise. Afirma que esta cistite crônica com exacerbaçõeõs periódicas vem de há 12 anos.

Resultados — Após o uso da cultura líquida de *Zymomonas mobilis* passou um ano sem crises.

CONCLUSÕES

Embora reconhecendo o número exíguo de casos apresentados, o autor sugere um estudo sistemático e racionalizado dos quadros clínicos nos quais esta terapêutica se demonstra eficaz. Estudos neste sentido encontram-se em andamento.

SUMMARY

Zymomonas mobilis (Lindner) Kluyer & van Niel, 1936. (*Termobacterium mobile* Lindner, 1928; *Pseudomonas lindneri* Kluyer & Hoppenbrouwers, 1931) isolated from "pulque" (Mexican typically drink known since Pre-Cortezian

age) by Lindner in 1924, was employed as liquid cultures (Ag-11 strain isolated in Mexico by Gonçalves de Lima in 1950) "per os" administered (300 ml. a day at 100 ml. doses between the meals) to 7 humans bearing chronic infections, (6 chronic entero-colites and 1 chronic cystite agravated by periodics acute exarcebations).

The author report the good results (no more subjective and objetive symptoms) in all 7 cases previously and intensively treated by chemotherapeutics and antibiotics drugs without favourable results.

The author knowing the small number of cited cases suggest a sistematic and rationalised study of the clinic entities in which therapeutics eficacy was recognized as high.

New experiments is beeing done on the subject.

ZUSAMMENFASSUNG

Das *Zymomonas mobilis* (Lindner) Kluyver & van Niel, 1936 (*Termobacterium mobilis* Lindner, 1928; *Pseudomonas lindneri* Kluyver & Hoppenbrouwers, 1931) wurde aus dem "Pulque" isoliert (ein typisches mexikanisches Getraenk, welches aus der Vor-Cortezianischen Zeit stammt) Lidner im Jahre 1924, wurde in Form von fluessigen Kulturen angewendet, (Stamm Ag-11 von Gonçalves de Lima im Jahre 1950 in Mexiko isoliert), (Gesamtmenge 300 ml. verteilt auf 3 gleiche Dosen in der Zwischenzeit waehrend der Mahlzeiten) an 7 Traeger chronischer Infektionen, von denen 6 Darm-Infektionen und einer chronische Cystit mit starken periodischen Krisen hatte.

Es wird ueber die erhaltenen zufriedenstellenden Ergebnisse berichtet (Verschwinden der objektiven und subjektiven Symtome) in allen 7 Faellen, die vorher auf ausdauernde Weise und ohne Erfolg mit Antibiotika und Chemotherapeutika behandelt wurden.

Der Verfasser, der die Anzahl der betreffenden Faelle kennt, schlaegt ein systematisches und rationalisiertes Studium der klinischen Bilder vor, in welchen sich diese Therapeutik als gut bewies.

RESUMÉ

Zymomonas mobilis (Lindner) Kluyer & van Niel, 1936. (*Termobacterium mobile* Lindner, 1928; *Pseudomonas lind-*

neri Kluyer & Hoppenbrouwers, 1931) isolée du "pulque" (boisson typiquement mexicaine connue depuis l'arrivée des Espagnols) en 1924 par Lindner, a été employée sous forme de cultures liquides (souche Ag-11 isolée par Gonçalves de Lima au Mexico en 1950) administrées "per os" (total de 300 ml. réparti en trois doses égales entre les repas) à 7 porteurs d'infections chroniques, soit six entêrocolites et 1 cystite chronique à crises aigües périodiques.

On relate les résultats satisfaisants obtenus (disparition des symptômes objectifs et subjectifs) dans la totalité des 7 cas, qui avaient auparavant été traités sans succès par tous les remédes antibiotiques et chimiques.

L'auteur, reconnaissant le petit nombre de cas présenté, suggère une étude systematique et rationelle des cadres cliniques dans lesquels cette thérapeutique s'est révélée efficace.

Des études dans ce but se poursuivent actuellement.

BIBLIOGRAFIA

FRANCISCI HERNANDI, de História Plantarum Novae Hispaniae, Livro VII, 251 — 258. MDCCLXXX. *

CLAVIGERO FRANCISCO SAVERIO, The History of Mexico, Book *VII*, Sec. ES. London, 435. 1807. *

DOLLEY CHARLES S., "Notes on maguey sap and aguamiel, a Therapeutic agent of High Value" en Therapeutic Gazette(March 12, 1911.*

LINDNER P. — Gaerungsspninx und Kobold Alkohol. Neue Erkenntnisse über Gaerung, Atmung und Stoffwechsel Wochenschr. f. Brauerei XI (12): 2, (Sonderdr.) 1928.

LINDNER P. — Zur Bekaempfung der Bangkrankheit bei Mench und Tier. Zeitsch. f. Spirit. Ind. LXII Nr 48: 338, 1939.

---

* OSWALDO GONÇALVES DE LIMA — El Maguey y el Pulque en los Códices mexicanos. Fondo de Cultura Economica — Primeira Edição. 1956.

OBSERVAÇÕES SÔBRE A ATIVIDADE ANTAGONISTA DE ALGUNS BASIDIOMICETOS ISOLADOS EM PERNAMBUCO

O. Gonçalves de Lima, Maria Helena Dália Maia e Marisa Machado de Albuquerque

São apresentadas observações sôbre a ação de algumas cêpas de basidiomicetos isolados pelo Prof. Dr. Carroll William Dodge, das matas úmidas nos arredores do Recife.

Tivemos recentemente a oportunidade de receber do Prof. Carroll William Dodge e de sua espôsa Dra. Bertha Sanford Dodge, uma valiosa contribuição aos nossos trabalhos, com a oferta que nos fizeram de cultivos de basidiomicetos, resultado de suas pesquisas em nossas florestas úmidas, nas cercanias do Recife.

Tal coleção nos há proporcionado meio de iniciar entre nós uma investigação preliminar sôbre a ação antagonista de algumas cêpas da região, considerando os trabalhos de Bose (1944, 1945, 1946), Meyer (1944), Atkinson (1946), Mathieson (1946) e outros, sôbre antibióticos produzidos por várias espécies de basidiomicetos, incluindo sobretudo *Polysticus sanguineus* L., *Polyporus cinnabrinus*, *Polytictus versicolor*, *Irpex destruens*.

Robbins (1945, 1946, 1949) provou pelo método de estrias um número considerável de basidiomicetos a partir de 1943, por cultivo em gelose em placa de Petri, usando *St. aureus*, *E. coli*, *Myc. smegmatis* e aplicando, ademais, o método de discos de cultivo para os organismos que apresentavam destacada atividade. Alguns fungos muito ativos em meios sólidos, demonstravam muitas vêzes pouca atividade em meios líquidos, obtendo-se no entanto, algumas vêzes, atividades-diluição máximas de 1.000 a 2.000, contra *St. aureus*.

Comenta Vogel (1951) o fato de que das 30.000 espécies de basidiomicetos conhecidas, haverem já naquela época sido provadas cêrca de 1.000 em suas propriedades antagonistas contra outros microrganismos, observando-se que 40% mostraram clara atividade contra *St. aureus*, enquanto contra *E. coli* sòmente poucas foram ativas. Os gêneros mais estudados foram *Polyporus*, *Fomes* e *Porias*.

As cêpas utilizadas neste trabalho foram isoladas pelo Prof. Dodge de lenhos em decomposição, recolhidos nas matas do Horto Zoobotânico de Dois Irmãos no Recife.

O método inicialmente usado para detecção da atividade antagonista, foi o das estrias cruzadas de Garré, porém, devido ao crescimento demasiado rápido e invasivo dos fungos que cedo recobriram tôda a superfície do meio, tivemos de optar pelas colônias gigantes (aos três dias de crescimento) de cada grupo e estrias radiais dos germes de prova.

QUADRO I
Inibição dos cultivos, em mm

	POLYSTICTUS SANGUINEUS		POLYSTICTUS SP		STEREUM SP		HYPOLYSSUS SP		POLYPORUS SP		FAVOLUS SP	
	AN	SAB	AN	SAB	AN	SAB	AN	SAB	AN	SAB	AN	SAB
BACILLUS SUBTILIS	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	0	0
STAPHYLOCOCCUS AUREUS	0	0	0	5	0	0	0	0	0	10	0	0
ESCHERICHIA COLI	0	0	0	4	0	15[a]	0	0	0	15[a]	0	0
KLEBSIELLA PNEUMONIAE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	17	0
PROTEUS MORGANII	0	10[a]	0	10[a]	0	10[a]	20[a]	0	20[a]	15[a]	19[b]	0
MYCOBACTERIUM SMEGMATIS	5	10[a]	0	25[a]	0	10[a]	20[a]	10	20[a]	15[a]	0	0
PSEUDOMONAS AERUGINOSA	0	0	0	8	0	0	0	0	0	7	0	0
CANDIDA ALBICANS	25[a]	0	20[a]	0	0	0	0[c]	0	0	0	15[a]	0

(a) Inibição total da estria
(b) algumas colonias resistentes
(c) crescimento fraco

Foram os seguintes os basidiomicetos utilizados: *Polystictus sanguineus, Polystictus sp., Stereum sp., Hypolyssus sp., Polyporus sp., Favolus sp.*

Uma rápida análise dos resultados, nos mostra que foi desprezível a atividade dos fungos, contra os germes Gram-positivos e contra o Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa*.

Para *E. coli* houve forte inibição em meio açucarado, com três dos fungos testados (figs. 1, 2 e 3), sendo interessante notar que para a *Candida albicans* ocorreu o inverso, pois apenas no meio que não continha açúcar foi notada a ação inibidora (figs. 4, 5 e 6). Êste fato de a atividade contra *Candida* regredir em meios que contenham açúcar já havia sido notado em anteriores trabalhos nossos, com espécies de *Streptomyces* com ação antimicótica.

Para *K. pneumoniae* sòmente o *Favolus sp.* mostrou boa atividade, enquanto que os germens *P. morganii* e *Myc. smegmatis* foram antagonizados por quase todos os basidiomicetos provados (figs. 6. 7. 8, 9 e 10).

RÉSUMÉ

Les auters présentent quelques résultats de leurs expériences sur l'action antagoniste de souches de basidiomicètes récemment isolés par le Dr. Carroll William Dodge et sa femme, le Dr. Bertha Sanford Dodge, dans le bois en décomposition des forêts humides des environs de Recife.

On a utilisé la méthode de la colonie géante et des stries croisées; l'action des fungus contre les germes Gram-positifs et *Ps. aeruginosa* s'est révélé négligeable. Contre *E. coli* on a noté, dans certains cas, une forte action inhibitrice en milieu sucré, tandis qu'il est intéressant de noter qu'avec le *Candida albicans* c'est le contraire qui s'est constaté auparavant par nous avec les cultures de *Streptomyces*.

Pour *K. pneumoniae* seul le *Favolus* a montré une bonne activité, tandis que les germes *P. morganii* et *Myc. smegmatis* se sont révélé très vulnérables.

SUMMARY

The authors relate some results of their research about the antagonistic action of strains of Basiosimycetes recently isolated by professor Carroll William Dodge and his wife Dr. Bertha Sanford Dodge from rotten timbers in forests near Recife (Pernambuco, Brazil).

The antimicrobial activity was determined from giant colony by the streak method, being very weak the action

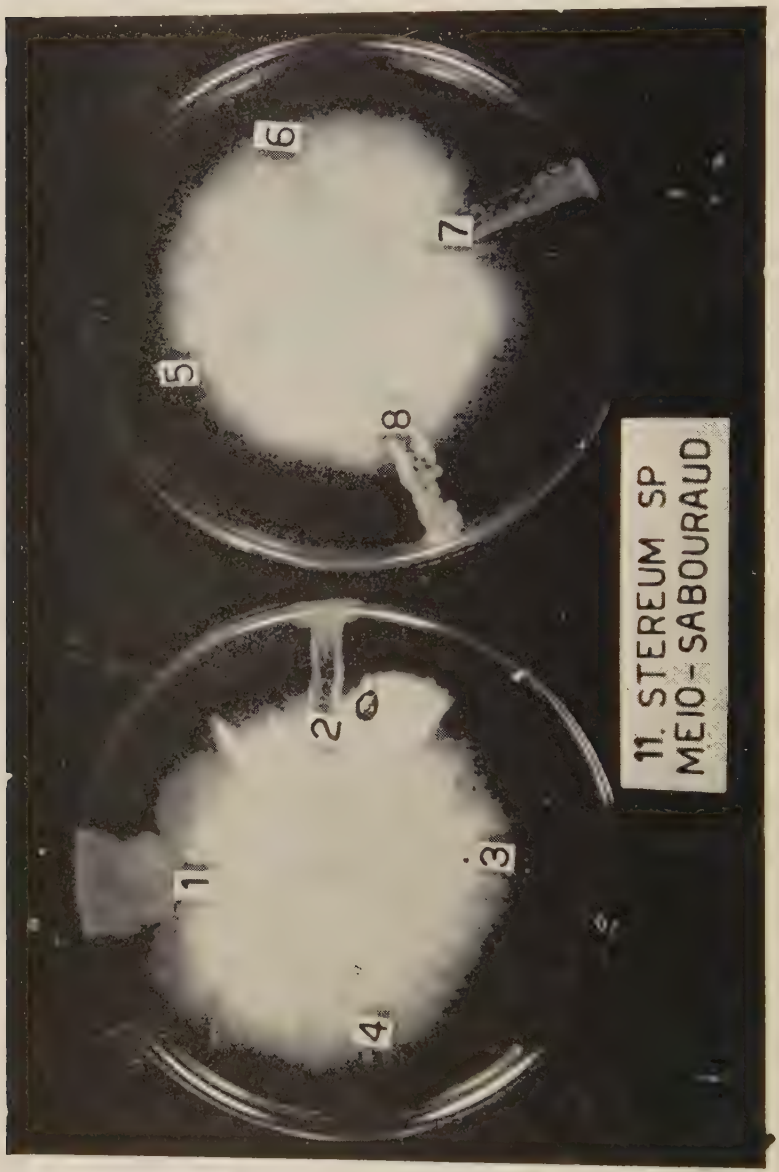
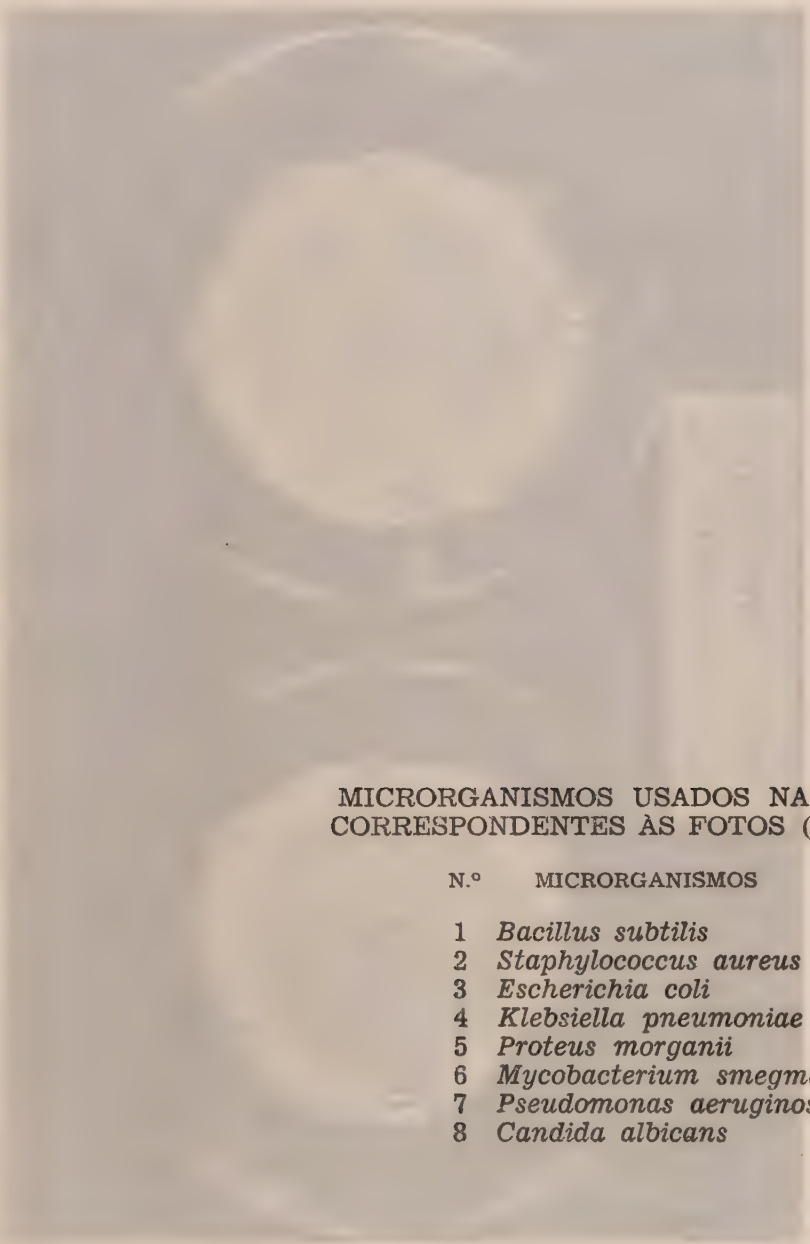


Fig. 1



MICRORGANISMOS USADOS NAS PROVAS CORRESPONDENTES ÀS FOTOS (FIGS. 1-10)

N.º	MICRORGANISMOS
1	*Bacillus subtilis*
2	*Staphylococcus aureus*
3	*Escherichia coli*
4	*Klebsiella pneumoniae*
5	*Proteus morganii*
6	*Mycobacterium smegmatis*
7	*Pseudomonas aeruginosa*
8	*Candida albicans*

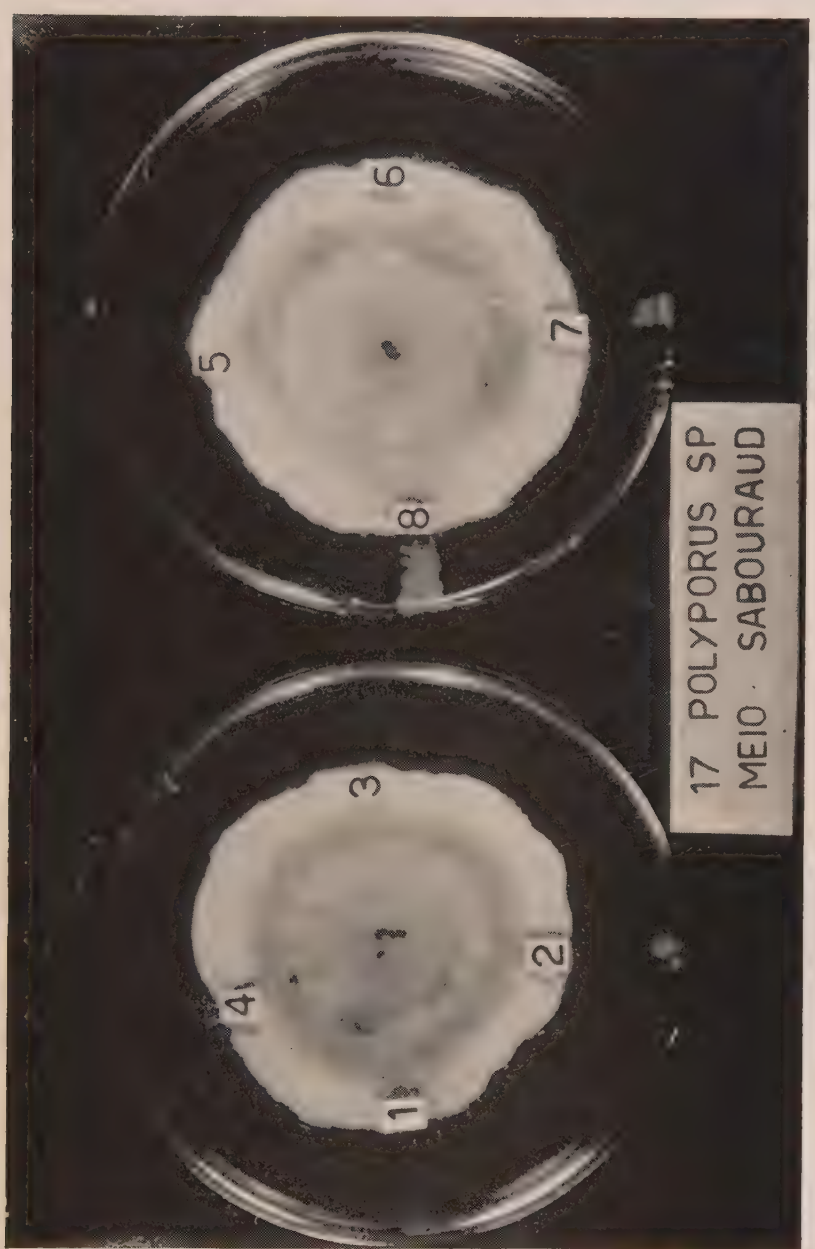


Fig. 2

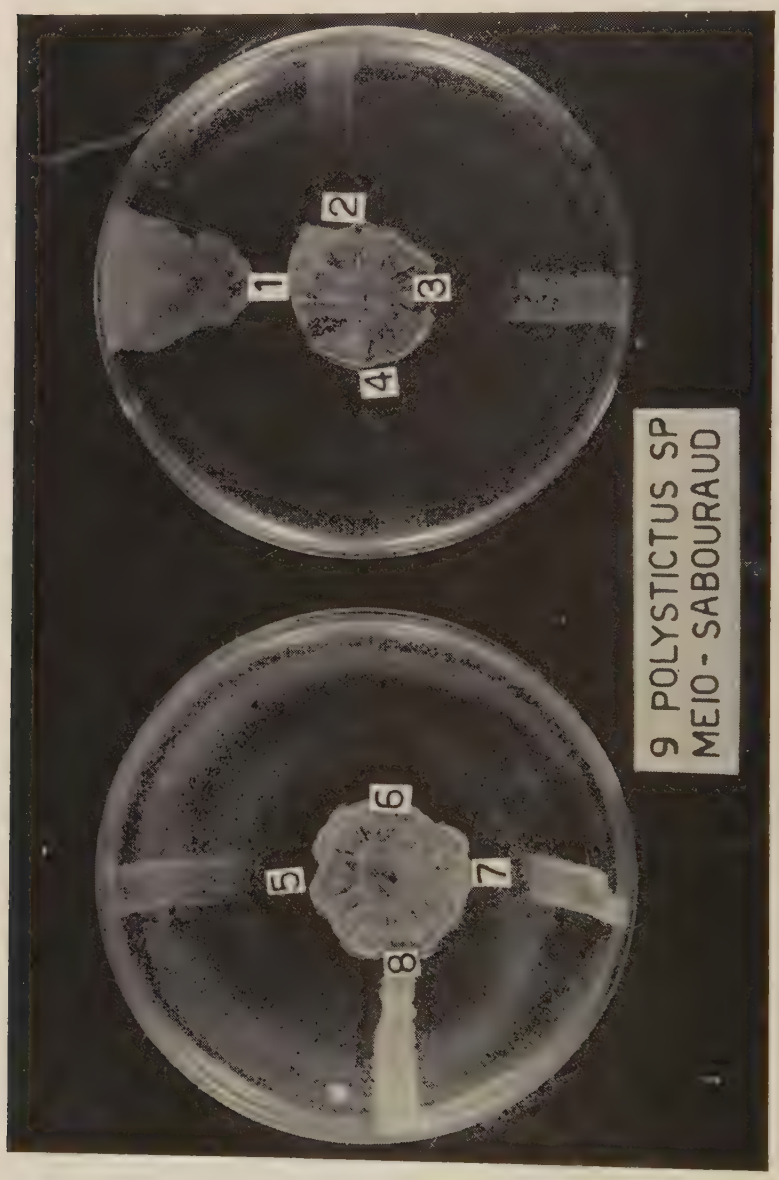


Fig. 3

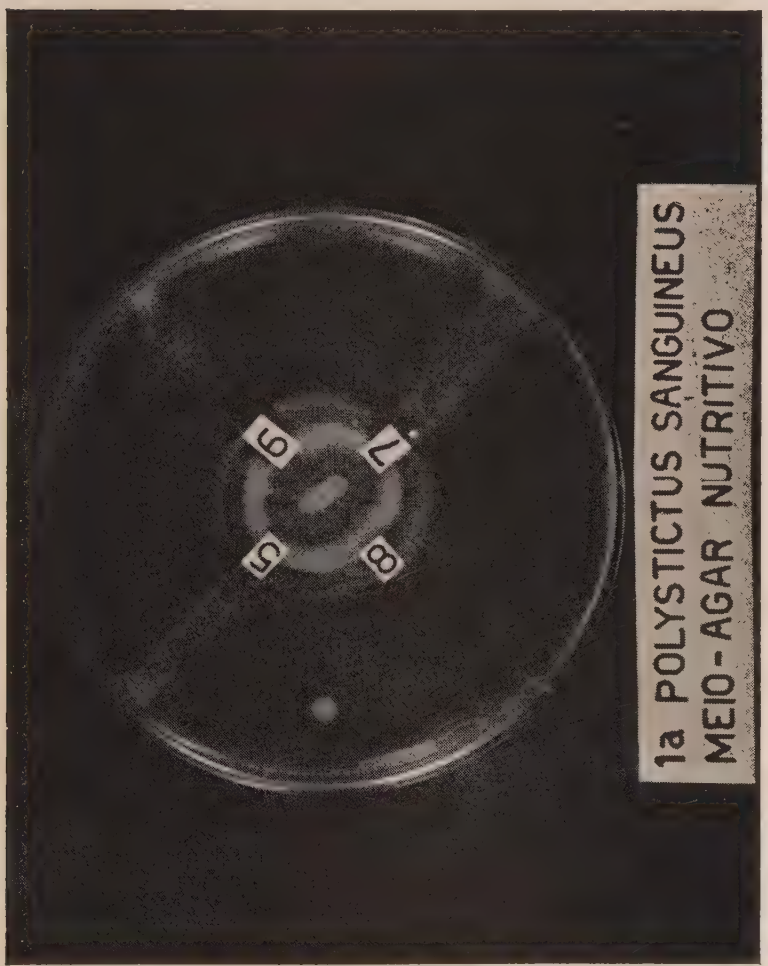


Fig. 4

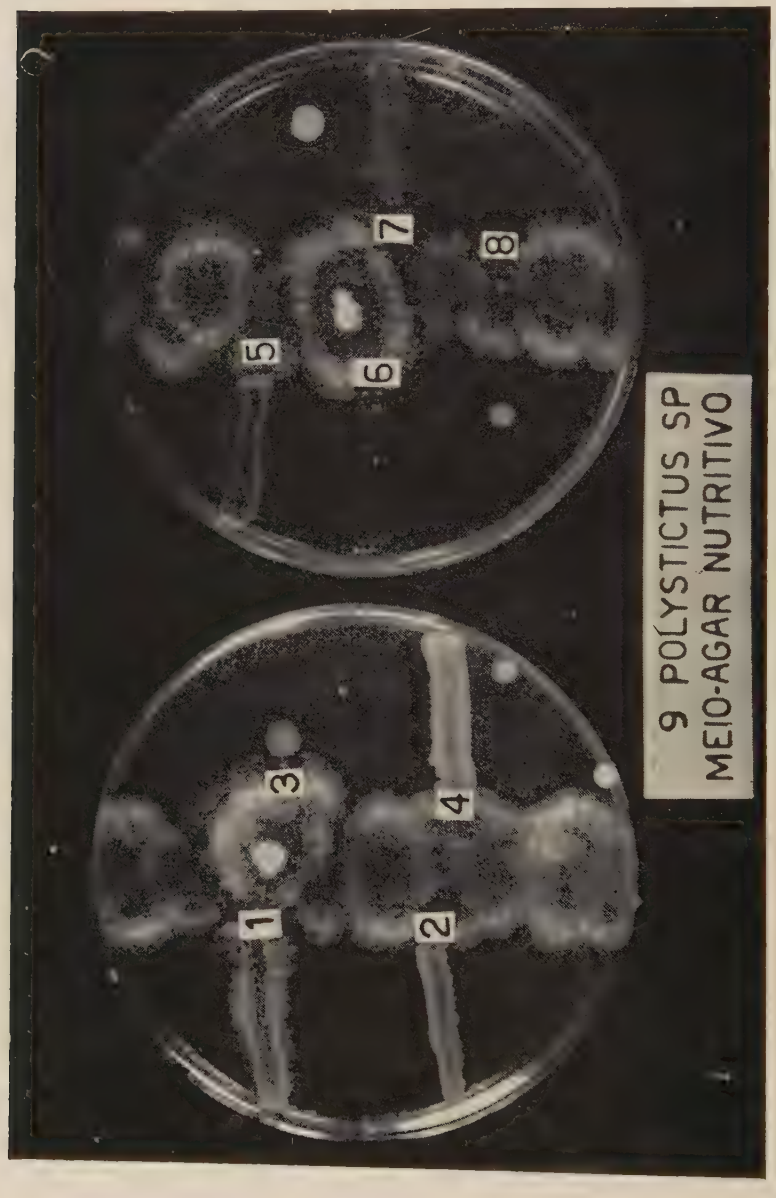


Fig. 5

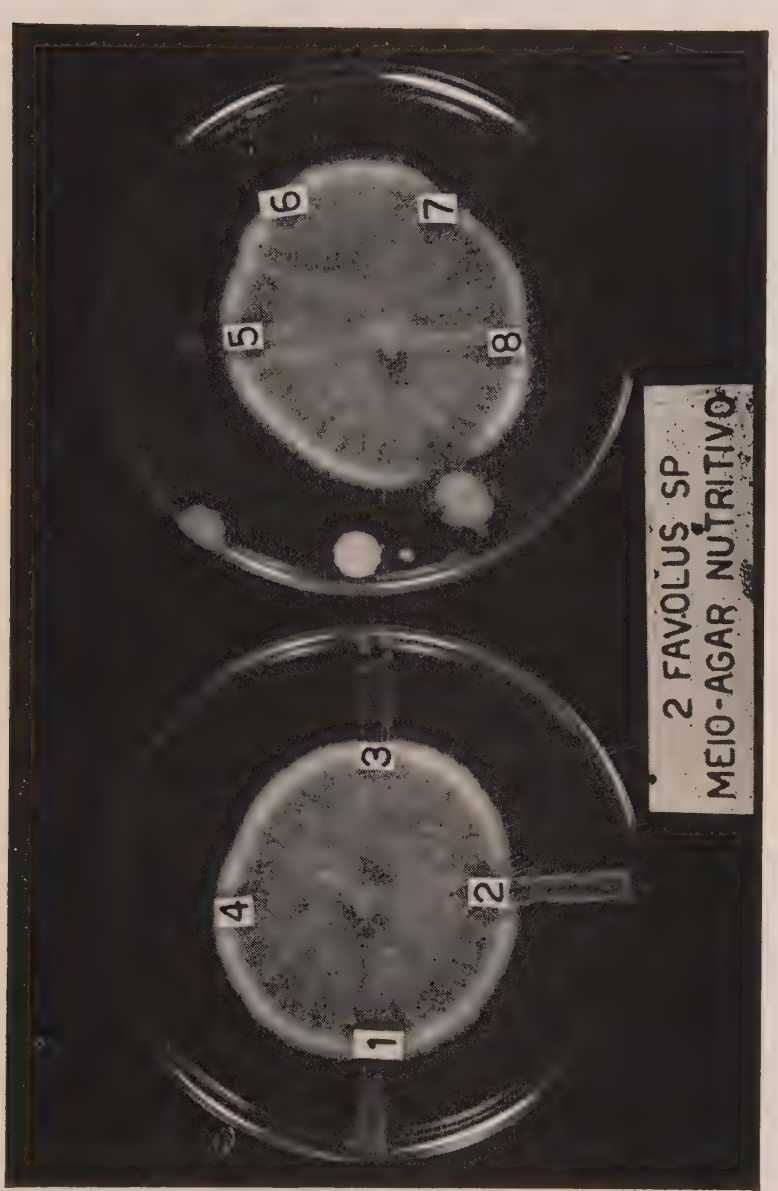


Fig. 6

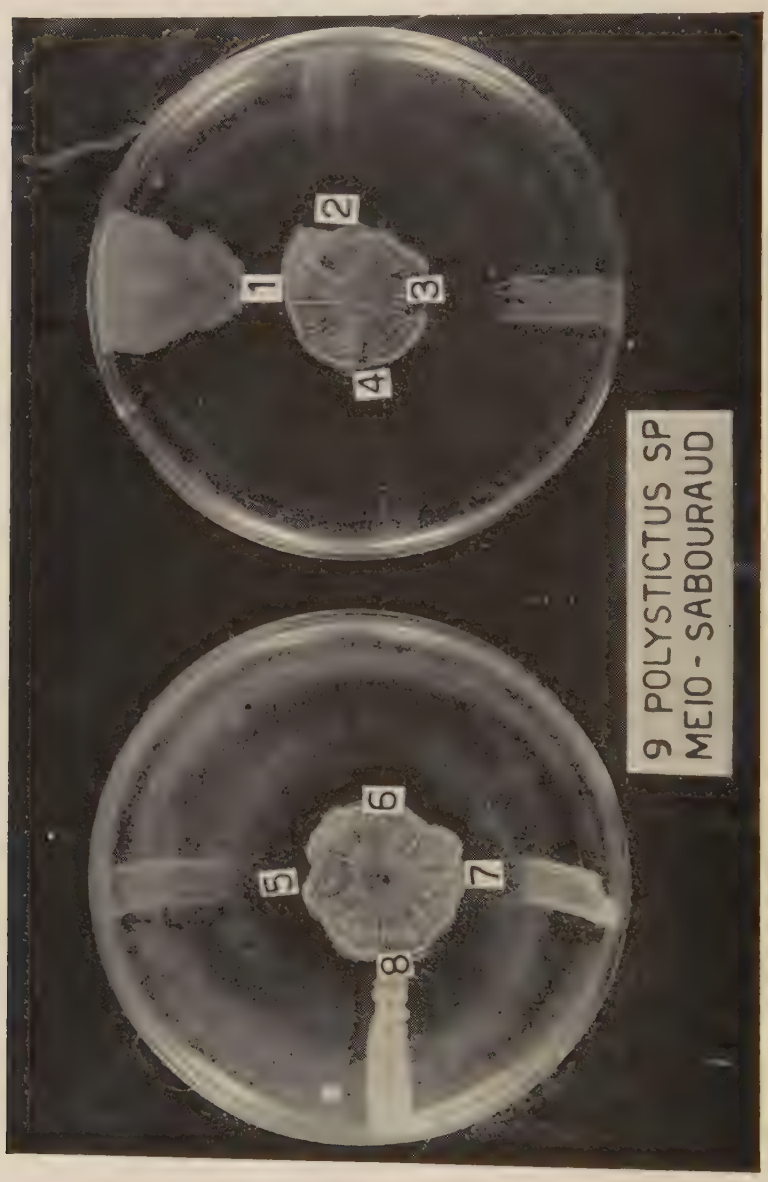


Fig. 7

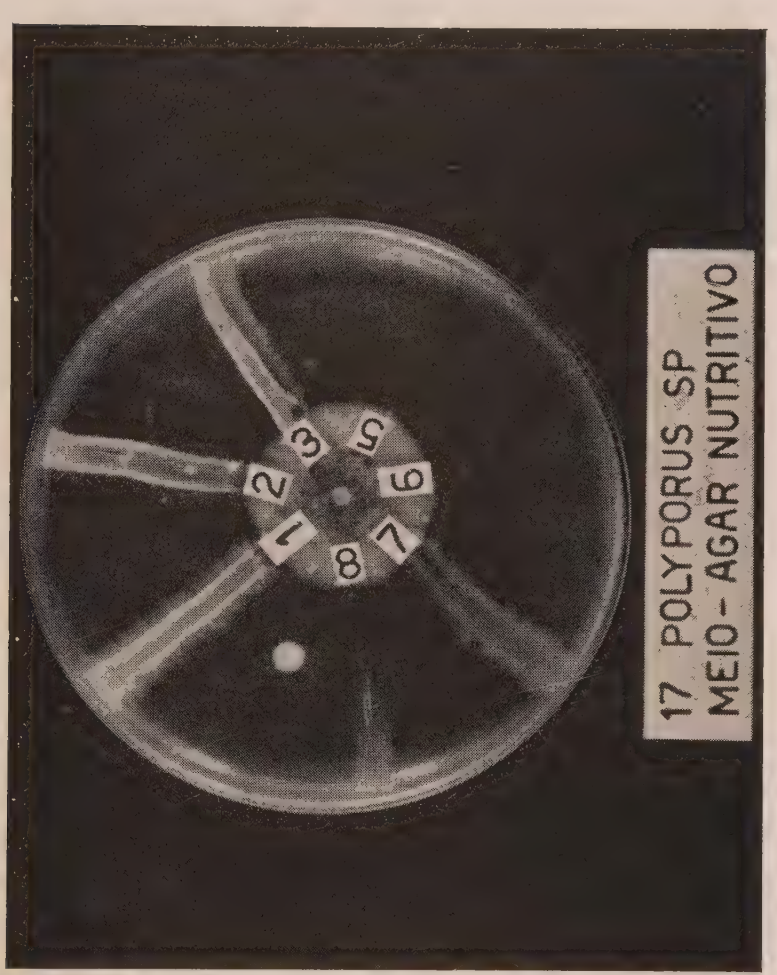


Fig. 8

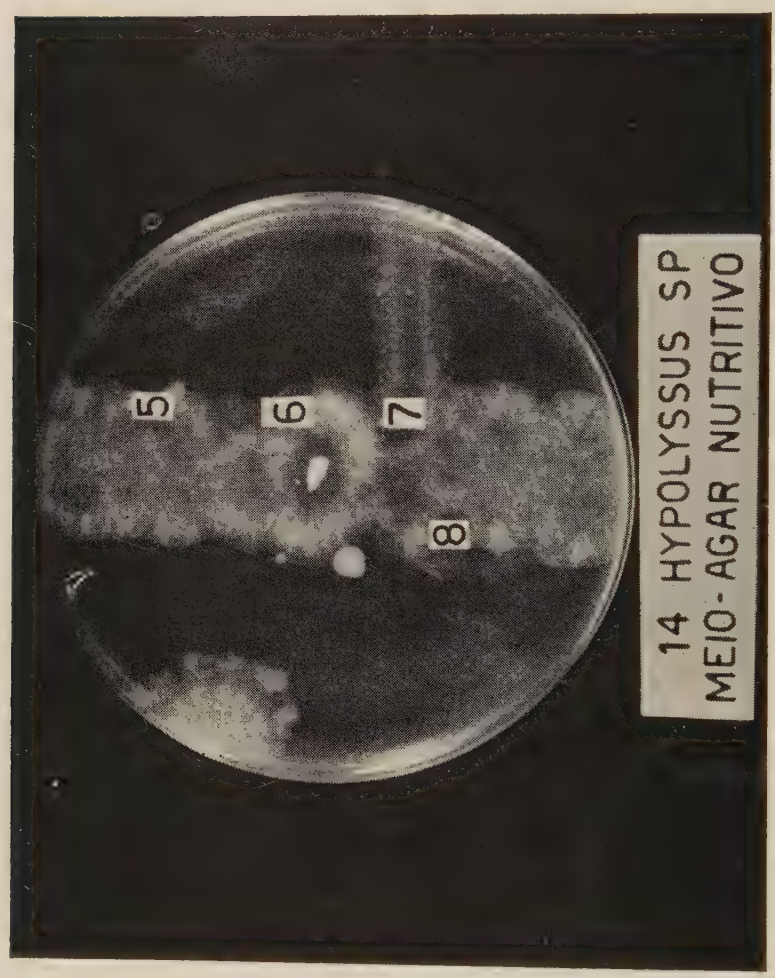


Fig. 9

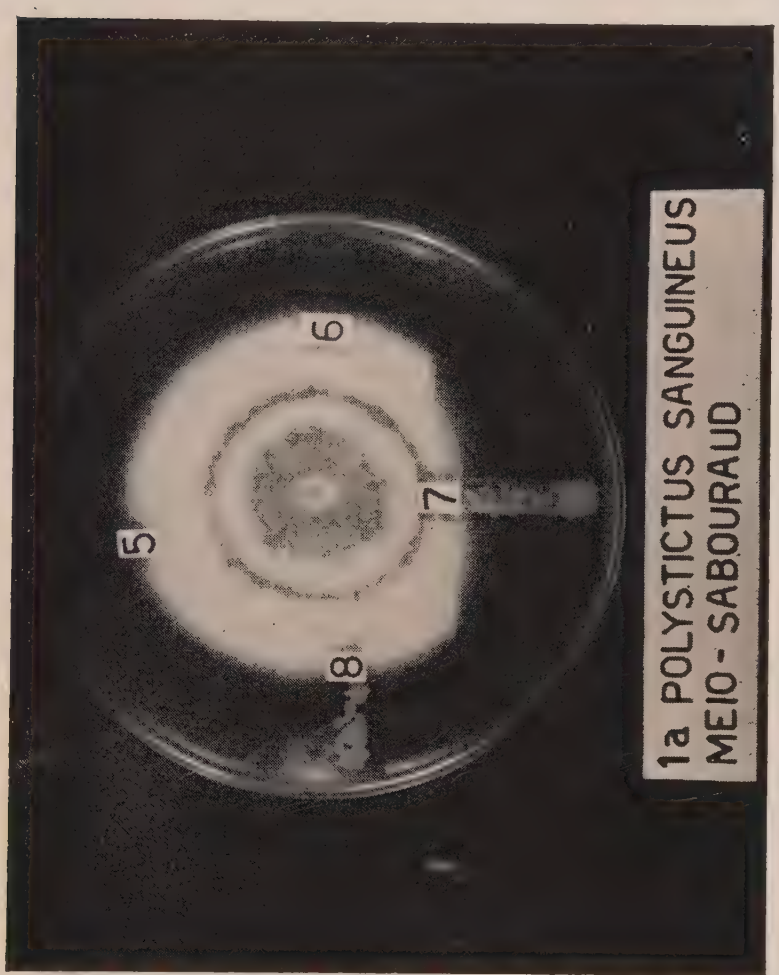


Fig. 10

of the fungi strains against Gram-positive germs and *Ps. aeruginosa.*

It was found that some strains exert in sugar containing media strong activity against *E. coli.* With *Candida albicans* the results were opposite; only in the media without sugar, they presented activity, a fact previously observed with the *Streptomyces* cultures.

The only strain with excellent action against *K. pneumoniae* was *Favolus sp.* while *P. morganii* and *Myc. smegmatis* were antagonized by several strains.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verfasser legen einige Versuchsergebnisse ueber die antagonistische Taetigkeit von Staemmen der Basidiomyceten vor, welche neuerdings von Dr. Carroll William Dodge und seiner Gemahlin Dr. Bertha Sanford Dodge von in Verwesung befindlichen Hoelzern der feuchten Waelder Umgebung von Recife isoliert wurden.

Eine Riesen-Kolonie und Kreuzstrichmethode wurde angewandt, wobei sich die Tatigkeit der Pilze gegen Grampositive Mikroorganismen und gegen *Ps. aeruginosa* als geringschaetzig erwies. Bei *E. coli* gab es in einigen Faellen starke Hemmung in zuckerhaltigen Mittel, wobei es interessant ist zu beobachten, dass sich bei *Candida albicans* das Gegenteil zeigte und zwar mit Hemmung in zuckerfreien Mittel, eine Tatsache welche wir schon frueher bei Kulturen von *Streptomyices* beobachteten.

Fuer *K. pneumoniae* zeigte nur *Favolus* eine gute Wirksamkeit, waehrend *P. morganii* und *Myc. smegmatis* als sehr empfindlich befunden wurden.

REFERÊNCIAS

ATKINSON, N., Antibacterial in Members of the Higher Fungi. I, *Cortinarus rotundisporus* and *Psalliota xanthoderma. Austral. J .Exptl. Biol. Med. Sci. 24,* 169 (1946).

BOSE, S. R., CHOUDHURY, A. C., *Curr. Sci. 13,* 233 (1944).

BOSE, S. R., Antibacterial action of *Polysporus* against *Typhoid, Cholera, Dyphtery and B. coli. Nature 156,* 171 (1945).

BOSE, S. R., Antibiotics in a *Polyporus* (*Polyporus sanguineus*). *Ibid.* 158, 292 (1946).

MATHIESON, J., Antibiotics from Victorian Basidiomycetes. *Austral. J. Exptl. Biol. Med. Sci. 24,* 57 (1946).

MEYER, J. R., *Biológico 10, 165* (1944).

ROBBINS, W. J., A. HERVEY *et al.*, A survery of some wood-destroying and other Fungi for antibacterial Activity. *Bull. Torrey Botan. Club. 72,* 165 (1945).

ROBBINS, W. J., F. KAVANAGH and A. HERVEY, Production of Antibiotic substances by Basidiomycetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci. 48,* 67 (1946).

ROBBBINS, W J., Basidiomycetes as possible sources of Antibiotics. *Antibiotics* (Chem. Publ. Co.) *172* — 185 (1949).

VOGEL, H., *Die Antibiotika* (Verl. Haus Carl, Nürnberg) *341* (1951).

ERIGRISINA — UM ANTIBIÓTICO PRODUZIDO POR *STREPTOMYCES* (*S. ERYTHROGRISEUS* MORAIS & DÁLIA MAIA, 1959)

Francisco Décio de Andrade Lyra, Marisa Machado F. de Albuquerque, Oswaldo Gonçalves de Lima, J. O. Falcão de Morais e Myrtes da Silveira Bispo

Uma nova espécie do gênero *Streptomyces (S. erythrogriseus)* produz uma substância antibiótica ativa principalmente contra Gram-positivos. Trata-se, provàvelmente, de um novo antibiótico a que os autores denominam *Erigrisina*. Neste artigo relatam-se os métodos de produção, extração e purificação da substância, além de suas principais características físico-químicas e biológicas.

Os autores levaram a efeito um estudo sôbre a substância produzida pelo *Streptomyces erythrogriseus* (Falcão de Morais & D. Maia, 1959) sendo levados a crer tratar-se de um novo antibiótico a que denominaram Erigrisina.

Neste artigo são descritos os métodos de produção e purificação do antibiótico, bem como algumas características físico-químicas e biológicas do mesmo.

Produção do antibiótico e seu isolamento

Cêpas — Duas cêpas de *S. erythrogriseus*, isoladas da mesma amostra de solo, são capazes de produzir o antibiótico em meio líquido (as de ns. 1172 e 1173); entretanto,

* Recebido para publicação a 31 de dezembro de 1959.

a cêpa 1173 deu melhores rendimentos, a substância aqui estudada tendo sido por ela produzida.

O antibiótico é obtido de cultivos agitados à temperatura ambiente (28-30° C) durante 72 h, no Meio 1 (glicose "Karo", 10 g; farinha de soja, 10 g; CO_3Ca, 1 g; cloreto de sódio, 5 g; água destilada, 1000 ml), alcançando-se uma atividade média de 1000 u/ml (germe de prova *B. subtilis* 9). Do líquido de fermentação filtrado extrai-se o princípio antibiótico por adsorção com carvão ativo Merck (Hellige's Reagens R 444), 1.5%, a pH entre 7 e 9, e eluição com metanol ácido; ou na mesma faixa de pH, por dupla extração com n-butanol, utilizando-se de cada vez um equivalente a 1/3 do volume do líquido metabólico ao qual se tem adicionado prèviamente 20 g de cloreto de sódio por 100 ml.

Na purificação do antibiótico podem ser seguidos métodos diversos, como sejam, precipitação dos eluados metanólicos ou dos extratos butílicos concentrados, por acetona, clorofórmio ou éter etílico, descartando-se os precipitados inativos. Os sobrenadantes são evaporados à secura e os resíduos, tomados em pequeno volume de metanol são cromatografados em coluna de alumina ácida com 2.5 cm de diâmetro e 20 cm de altura, utilizando-se como soluções percoladoras éter etílico + metanol, em diversas proporções e usadas na seguinte ordem: éter etílico 100%; com 5% de metanol; com 20% de metanol; com 50% de metanol; e metanol 100%. Foram recolhidas diversas frações de cada solvente, o gráfico de atividade das quais é apresentado na fig. 1.

Além disso, um outro processo empregado com igual êxito na purificação do antibiótico consiste no seguinte: o sobrenadante cetônico é evaporado, o resíduo graxo tomado por água é adicionado de cloreto de sódio (20 g por 100 ml), o pH é ajustado a 8.5, em seguida extraindo-se a substância ativa com 20% de álcool benzílico (4 extrações foram necessárias). (Êste método é uma adaptação daquele seguido por Sensi & Timbal, 1959). O extrato benzílico, tratado por sufato de sódio anidro e filtrado, é, então precipitado pela adição de éter etílico. A maior atividade permanece no líquido sobrenadante, ao qual se junta ligroína. Forma-se um precipitado ativo, porém a maior atividade permanece na fase líquida, a qual, por evaporação a vácuo dá lugar a um resíduo graxo com a atividade de 0.04 a 0.06 mcg/ml contra *B. subtilis* 9.

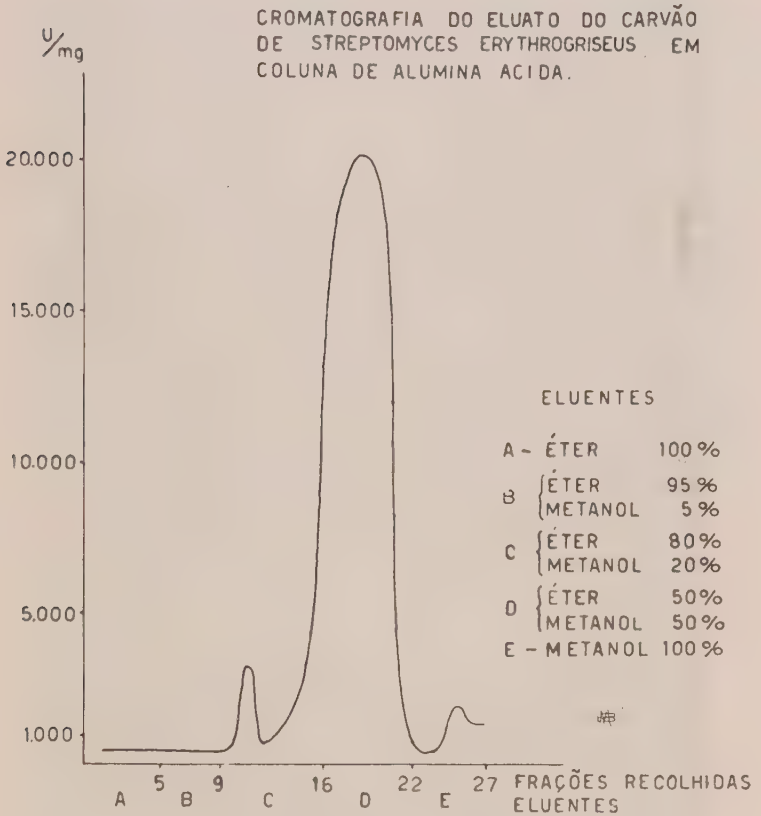


Fig. 1

Características da Erigrisina

A substância obtida por cromatografia em alumina apresenta-se como u'a massa amorfa, de coloração marrom escura, muito solúvel em água, metanol, etanol e butanol; pouco solúvel em acetona, acetato de etila e éter etílico, pràticamente insolúvel em benzeno, ligroína e clorofórmio.

Submetida a eletroforese (tampão pH 5.0, 300 volts, 15 horas) comportou-se como se constituída por duas componentes, uma de caráter anfótero e outra básica (fig. 2).

Seu cromatograma sumário, em que foram usados os solventes abaixo relacionados (modificação de O. Gonçalves de Lima, 1959) pode ser visto na fig. 3.

Fig. 2 — Eletroforese da Erigrisina (Bioautograma *B. subtilis* 9).

Fig. 3 — Cromatograma sumário da Erigrisina (Biautograma *B. subtilis* 9).

Solventes:

1 — Água destilada
2 — Cloreto de amônio a 3%
3 — Tampão pH 7.9 — 8.0
4 — Solução saturada de ácido pícrico
5 — Metanol 96%
6 — Acetona
7 — Acetato de etila saturado com água
8 — n-Butanol saturado com água
9 — Éter etílico saturado com água
10 — Clorofórmio
11 — Benzeno
12 — Éter de petróleo.

Reações químicas — Negativas: Millon, Schiff, maltol, Sakaguchi e os testes para eritromicina, para carbomicina e guanido, segundo Grove e Randall (1955); a reação de Molisch deu fracamente positiva e a de Benedict muito fracamente positiva (impurezas?). Uma particularidade interessante da substância é a mudança de coloração que suas

soluções apresentam com a variação do pH. A pH 4.5-5.0 uma solução da Erigrisina em água destilada é âmbar; a pH 8.0 é rósea-violácea, intensificando-se a coloração com o aumento do pH; a pH 2.0 é amarela. Como se vê a substância funciona como indicador ácido-básico.

Como o *S. erythrogriseus* tem alguma relação com o *S. erythraeus*, levamos a efeito algumas provas comparativas entre eritromicina e a substância 1173. Os dois antibióticos podem ser distinguidos por cromatograma sumário (comparar as figs. 3 e 4), eletroforese (fig. 2), cromatografia em papel (sistema n-butanol: ácido acético: água: 3:1:1:) e reação característica para eritromicina, (Grove e Randall, 1955), além da citada mudança de côr com o pH.

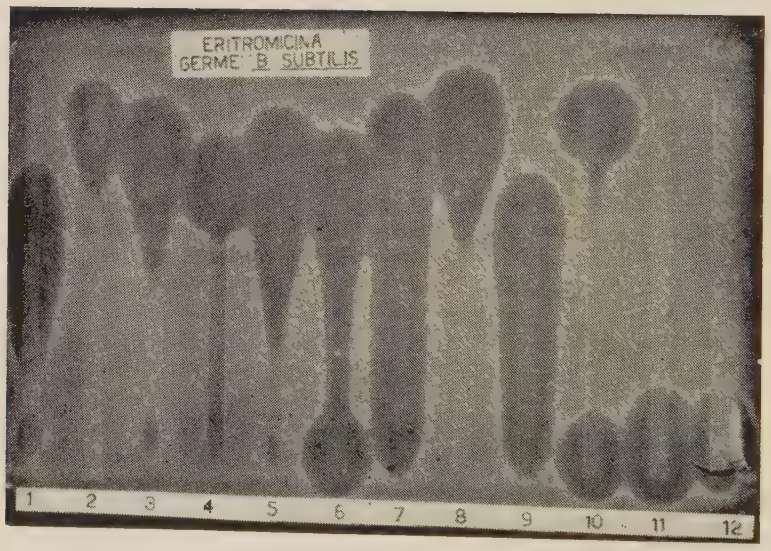


Fig. 4 — Cromatograma sumário da Eritromicina (Iloticina de Eli Lilly Co.) (Bioautograma *B. subtilis* 9).

Espectro antimicrobiano *in vitro* da Erigrisina (método de difusão em agar)

MICROORGANISMOS	mcg/ml
Bacillus subtilis 9	0.04 a 0.06
Bacillus anthracis	8.0 a 10.0
Bacillus mycoides	40.0 a 50.0
Micrococcus citreus	2.0 a 3.0
Staphylococcus aureus ATCC 10390	0.04 a 0.06
Staphylococcus aureus W	0.08 a 0.1
Diplococcus pneumoniae tipo 1	0.5 a 1.0
Sarcina lutea	0.4 a 0.6
Streptococcus pyogenes	0.5 a 1.0
Neisseria catarrhalis	5.0 a 8.0
Myc. tub. var. *hominis*	> 100
Myc. smegmatis	> 100
Myc. phlei	> 100
Nocardia asteroides	5.0 a 8.0
Escherichia coli SR*	20.0 a 30.0
Klebsiella pneumoniae	8.0 a 10.0
Shigella paradysenteriae	1.0 a 2.0
Salmonella typhosa	20.0 a 30.0
Brucella suis	3.0 a 4.0
Brucella melitensis	1.0 a 2.0
Brucella abortus	2.0 a 3.0
Candida albicans	75.0 a 100.0
Pseudomonas aeruginosa	30.0 a 40.0
Proteus vulgaris	20.0 a 30.0
Cryptococcus neoformans	> 100
Corynebacterium diphtheriae	0.5 a 1.0

As provas foram realizadas em agar-nutritivo, exceto para *D. pneumoniae* e *C. diphtheriae*, em que se empregou Eugonagar BBL.

* Resistente à estreptomicina.

Toxicidade — Aplicada subcutàneamente em camundongos suíços albinos o antibiótico revelou-se letal à dose de 75 mg/Kg; a DL_{50} está em tôrno de 50 mg/Kg.

SUMMARY

A species of the genus *Streptomyces*, differing from previously classified members of the genus, and designate as *S. erythrogriseus* (Rev. Inst. Antib. Univ, Recife, *2*, ns. 1 e 2, 63-67, 1959), produces a probably new antibiotic, erygrisin, active against many organisms. The substance is produced in a soybean meal medium (Medium 1) by agitation in Fernbach flasks.

Extraction methods: Adsorption on active carbon Merck (Hellige's Reagenz R 444) at pH 7.0 — 9.0 and elution with acid methanol; or extraction with n-butanol at the same range of pH.

Chemical and physical properties — The substance has a dark brown coloration; is soluble in water, methanol, ethanol and butanol; negative Schiff, Millon, maltol, Sakaguchi and the guanido test and the assays for Carbomycin and Erythromycin; weakly positive Molisch and Benedict (impurities?). Its aqueous solution has an amber coloration at pH 4.5 — 5.0; at pH 8.0 is rose-violaceous, changing to yellow at pH 2.0.

Biological properties — Active *in vitro* against Gram-positive bacteria; weakly active against Gram-negative ones.

Toxicity — When injected subcutaneously in mice the antibiotic showed to be lethal at 75 mg Kg; the LD_{50} lies around 50 mg/Kg.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine Art der Gattung *Streptomyces*, gaenzlich verschieden von irgend einem Mitglied genannter Gattung, schon frueher klassifiziert und als *S. erythrogriseus* benannt, (Rev. Inst. Antib. Univ. Recife, *2*, ns. 1 e 2, 63-67, 1959), erzeugt ein Antibiotikum welches gegen verschiedene Bakterien, hauptsaechlich gegen Grampositive aktiv ist.

Das Antibiotikum mit Erygrisin bezeichnet, wird in einer Naehrfluessigkeit mit Sojamehl als Base (Mittel 1) unter Schuettelung in Fernbach-Flaschen erzeugt.

Extraktionsmethoden. Adsorption mit aktiver Kohle-Merck (Reagens R 444 von Hellige) bei einem pH zwischen 7,0 — 9,0 und Elution mit saurem Methylalkohol; auch kann die Reaktion mit n-Butanol bei gleicher pH Grenze vorgenommen werden.

Physikalische und Chemische Eigenscharften: Die Substanz ist von dunkelbrauner Faerbung, loeslich in Wasser, Methylalkohol und Butanol; sie gibt negative Reaktionen bei Schiff, Millon, Maltol und Sakaguschi, wie auch bei den Guanido-Testen und bei Carbomycin und Erythromycin, schwach positive Reaktion bei Molisch und sehr schwach positive Reaktion bei Benedict (Verunreinigugen?). Die waessrige Loesung hat Bernstein-Faerbung bei einem pH von 4,5 — 5,0; bei einem pH von 8,0 ist sie rosaviolett und veraendert sich in's Gelbe bei einem pH von 2,0.

Biologische Eigenschaften: Aktiv *in vitro* gegen grampositive Bakterien und schwach aktiv gegen Gramnegative.

Toxitaet: Bei subkutaner Verabreichung in Maeusen zeigte sich, dass die letale Dosis bei 75 mg kg lag. Die LD_{50} ist ungefaehr 50 mg/kg.

REFERÊNCIAS

FALCÃO DE MORAIS, J. O. & M. H. DÁLIA MAIA. 1959. *S. erythrogriseus*: Novo *Streptomyces* produtor de antibiótico. Rev. Inst. Antib. Univ. Recife, *2*, ns. 1 e 2, 63-67.

GONÇALVES DE LIMA, O. 1959. Comunicação à *Sociedade de Biologia de Pernambuco* em sessão de 25 de setembro.

GROVE, D. C. & W. A. RANDALL. 1955. "Assay Methods of Antibiotics. A Laboratory Manual". Medical Encyclopedia, Inc. N. Y.

SENSI, P. & M. T. TIMBAL. 1959 — Isolation of two antibiotics of the Grisein and Albomycin group. Antib. & Chemo. *9*, 160-6.

DA AÇÃO DA ALIL-ISO-PROPILACETILCARBAMIDA ("SEDORMID") E DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO ADMINISTRADOS ISOLADOS E CONJUNTAMENTE SÔBRE O DESENVOLVIMENTO DO CARCINO-SARCOMA DE WALKER 256 (*)

Evans Silva, Lizete Lins de Oliveira e Myrtes da Silveira Bispo

É relatada a ação parcialmente inibidora do "Sedormid" sôbre o desenvolvimento do Carcino-sarcoma de Walker 256. A ausência de potencialização do efeito carcinostático do "Sedormid" pelo tratamento combinado com o peróxido de hidrogênio e a ineficácia do peróxido de hidrogênio utilizado isoladamente no desenvolvimento do mesmo tumor, são descritas.

INTRODUÇÃO

Tentativas de tratamento dos tumores experimentais pela administração de peróxido de hidrogênio e substâncias inibidoras da catalase isoladamente têm sido publicadas (Boyland e col. 1953; Cudkowicz, 1954; Makino e Tanaka, 1953; Hollcroft e Lorenz, 1952; e Holman, 1957a).

O trabalho de Holman (1957a) que relata a regressão do Carcino-sarcoma de Walker 256 pela adição de peróxido de hidrogênio a 0,45% na água de beber em 50 a 60% dos animais tratados foi ràpidamente refutada por vários pesquisadores (Chorazy e col., 1958; Ghadially e Wiseman, 1958; Green e Westrap, 1958 e Joffree, 1958).

Segundo ainda Holman (1957b), em algumas instâncias a regressão começa sòmente após os tumores haverem alcançado um mínimo de 40 mm., devendo-se tal fato a

(*) — Recebido para publicação em 23 de setembro de 1959.

uma concomitante diminuição da catalase corporal o que estaria de acôrdo com o feito observado por Greenstein e col. (1941a) de que a catalase hepática sem exceção encontra-se diminuida sensìvelmente em ratos portadores de tumores com 5% do pêso total dos animais.

Segundo Nakahara e Fukuoka (1948), a diminuição da catalase hepática nos animais portadores de tumores deve-se a liberação por parte dos mesmos de uma substância de natureza peptídica isolada em certo grau de pureza e denominada "Toxormônio".

Por outro lado, Schmid e col. (1955) verificaram que a administração oral de Alil-iso-propilacetilcarbamida ("Sedormid") a ratos na dose diária de 80 mg. provocou uma queda acentuada da catalase hepática.

Partindo da hipótese de trabalho de que seria mais factível a possibilidade da chegada do peróxido de hidrogênio às células tumorais em animais que estivessem com a catalase hepática bastante diminuida, resolvemos administrar o peróxido de hidrogênio seguindo a técnica de Holman (1957a) juntamente com o "Sedormid", assim como o peróxido de hidrogênio e o "Sedormid" isolados em ratos Sprague Dawley implantados com o Carcino-sarcoma de Walker 256.

MÉTODOS

20 ratos machos Sprague Dawley com pêsos variando entre 150 e 210 gm., implantados subcutâneamente na região escapular com fragmentos de 2 a 3 mm. obtidos de doador com 12 dias de implante, foram divididos em 4 grupos de 5 animais assim distribuidos:

Grupo 1 — Testemunha.
Grupo 2 — Peróxido de hidrogênio a 0,5% em água de beber.
Grupo 3 — "Sedormid" (**) por intubação gástrica diàriamente em suspensão aquosa com Tween 80, na dose de 250 mg/kg. de pêso corporal.
Grupo 4 — Peróxido de hidrogênio e "Sedormid" nas condições indicadas nos grupos 2 e 3.

Os tratamentos começaram 24 horas após o implante e prolongaram-se por 22 dias.

(**) — Obtido por cortesia de F. Hoffman — La Roche & Co.. Basle — Switzerland.

RESULTADOS

No 23.° dia após o implante, os tumores foram cuidadosamente dissecados e pesados, sendo as médias de pêso tumoral por grupo com relação ao grupo 1 (Testemunha) expressos em % de inibição (Tabela I).

TABELA I

% de inibição dos diversos grupos com relação ao grupo Testemunha e média de pêso de cada grupo em dados absolutos no início e término da experiência.

GRUPOS	% de inibição em relação ao Grupo I	Pêso médio em g. 1.° dia	23.° dia
1 (Test.)	—	204	233
2 (H_2O_2.)	7	201	197
3 ("Sedormid")	62	171	178
4 (H_2O_2 "Sedormid")	64	182	180

Dos resultados expressos na Tabela I infere-se:

1.° — "Sedormid" na dose e via utilizadas exerce uma ação carcinostática apreciável sôbre a evolução do Carcino-sarcoma de Walker 256.

2.° — O peróxido de hidrogênio nas condições utilizadas não apresenta ação carcinostática estatìsticamente significativa.

3.° — Não se verifica inibição significativamente potencializada quando o peróxido de hidrogênio e o "Sedormid" são utilizados conjuntamente.

4.° — As relações entre as inibições observadas nos Grupos 3 e 4 e as perdas de pêso em valores relativos ou absolutos em todos os grupos não justificam a asserção de que o efeito inibitório observado haja sido devido a extrapolação para o tumor de uma perda de pêso generalizada apresentada pelos portadores.

DISCUSSÃO

A inibição do Carcino-sarcoma de Walker 256 pela

administração de peróxido de hidrogênio ajuntado a água de beber na dose de 0,45% por pêso (Holman, 1957a) é "a priori" inexequível em virtude da grande reatividade do peróxido de hidrogênio e da ampla distribuição de catalase nos organismos.

A administração conjunta porém, de uma droga que diminuísse a catalase corporal total ou mesmo exclusivamente hepática, aumentaria a nosso ver a possibilidade de se obter uma maior concentração de peróxido de hidrogênio ao nível do tumor, ainda quando seguindo a técnica proposta por Holman.

Ainda de acôrdo com a proposição acima, a simples administração de substâncias inibidoras da catalase tumoral, possibilitaria o aumento da concentração do peróxido de hidrogênio nas células tumorais com uma conseqüente ação lesiva sôbre as mesmas, devido a uma intensificação de feitos já descritos nessas células ou seja: a) — decréscimo apreciável da catalase (Greenstein, 1941b) e maior quantidade de peróxido de hidrogênio (Rondoni e Cudkowicz, 1953).

O efeito parcialmente inibidor da azida sódica sôbre determinados tumores experimentais (Cudkowicz, 1954) poderia ser explicado pelo ponto de vista acima exposto, convindo lembrar no entanto que a azida sódica é um inibidor "in-vitro" da catalase enquanto que o "Sedormid" atua sòmente "in-vivo", o que segundo Schmid e col. (1955) se explicaria pelo fato de que o mesmo provoca uma baixa da catalase hepática bloqueiando a formação da mesma.

SUMMARY

The authors relate the inhibitory action statiscally significative of (2-Isopropyl-4-pentenoyl) urea ("Sedormid") on the development of Walker 256 Carcinosarcome when administered by gastric intubation every 24 hour-intervals during 22 days and in the dose of 250 mg/kg.

The inefficiency of hydrogen peroxide at 0,5% in drinking water is related as well as, the non-existence of potencialization in the effects obtained with "Sedormid" when a combined treatment was made with the drugs cited above.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verfasser berichten ueber die hemmende Wirkung von statischer Bedeutung des Allylisopropyl-Acetylharnstof-

fes (Sedormid) auf das Wachstum des Karzino-Sarkoms Walker 256 wenn genanntes Produkt mit Tube durch den Schlund alle 24 Stunden waehrend 22 Tagen bei einer Dosis von 250mg/kg Lebendgewicht verabreicht wird.

Gleichzeitig wird auch ueber die Unwirksamkeit des Wasserstoff-superoxydes berichtet, wenn dieses zu 0,5% dem Trinkwasser beigemischt ist; desgleichen auch ueber das Nichtvorhandensein einer Verwertung von "Sedormid", wenn dieses gemeinsam mit letztgenannten Produkt angewendet wird.

RESUMÉ

Les auters relatent, l'action inhibitrice statistiquement significative de l'Alil-iso-propil-acetil-carbamide ("Sedormid") sur la croissance de Carcino-sarcome de Walker 256, quand il est administré par tubage toutes les 24 heures pendant 22 jours et à la dose de 250 ml. Kg. de poids corporel.

Est également relatée l'inefficacité du péroxyde d'hidrogène à 0,5% dans l'eau de boisson, ainsi que l'inexistence d'un renforcement des effets obtenues avec le "Sedormid" quand nous faisons un traitement combiné avec les drogues citées.

REFERÊNCIAS

BOYLAND, E., and SARGENT, S. 1953. *Cancer Research 13,* Supp. 1,7.

CHORAZY, M.; GETTLICH, A.; GORAL, L.; KOLOCZEK, B.; and SZWEDA, Z. 1958. *Nature, 182,* 395-96.

CUDKOWICZ, E. 1954. *Tumori. 40,* 63.

GHADIALLY, F. N. and WISEMAN, G. 1958. *Nature 181,* 1067-69.

GREEN, H. N. and WESTRAP, J. W. 1958. *Nature 181,* 128-29.

GREENSTEIN, J. P.; JENRETTE, W. V. and WHITE, J. 1941a. *J. Natl. Cancer. Inst. 2,* 283.

GREENSTEIN, J. P.; JENRETTE, W. V. and White, J. 1941b. *J. Natl. Cancer. Inst. 2,* 17-22.

HOLLCROFT, J. W. and LORENZ, E. 1952. Proc. 2nd Nat. Cancer Conf. 582.

HOLMAN, R. A. 1957a. *Nature 179,* 1033.

HOLMAN, R. A. 1957b. *Symposium Internazionale Di Medicina Ed Igiene Sociale.* Trieste, settembre.

JEFFREE, G. M. 1958. *Nature. 182,* 892.

MAKINO, S. and TANAKA, T. 1953. *Gann. 44*, 39.

NAKAHARA, W. and FUKUOKA, F. 1948. *Japan. Med. J. 1*, 271.

RONDONI, P. and CUDKOWICZ, G. 1953. *Experientia. 9*, 348-49.

SCHMID, R.; FIGEN, J. F. and SCHWARTZ, S. 1955. *J. Biol. Chem.* 217, 263.

Von EULER, H. and HELLER, L. 1949. *Z Krebsforsch, 56*, 393-406.

DA AÇÃO DO CARBONATO DI-ETÍLICO NO DESENVOLVIMENTO DO CARCINO-SARCOMA DE WALKER 256. CONSIDERAÇÕES SÔBRE O MECANISMO CARCINOSTÁTICO DA URETANA

Evans Silva, Lizete Lins de Oliveira e Myrtes da Silveira Bispo

E' relatada a ineficácia do carbonato-di-etílico no desenvolvimento do Carcino-sarcoma de Walker 256, assim como baixa toxidez e intensa ação sedativa. Considerações rápidas a respeito da especificidade estrutural da uretana para a obtenção de efeitos carcinostáticos são apresentadas.

INTRODUÇÃO

No decurso de investigações sôbre os efeitos de exposição aos raios Roentgen, Nettleship, Henshaw e Meyer (1943), verificaram a ação cancerígena pulmonar do carbamato de etila (utilizado como anestésico) em camundongos da cêpa C_3H.

Trabalhos subsequentes (Henshaw e Meyer, 1944 e 1945; Selbie e Thackray, 1948), estabeleceram em definitivo que a uretana é um potente carcinogênico pulmonar.

Haddow e Sexton, (1946) verificaram a ação carcinostática da uretana no carcino-sarcoma de Walker 256 e sôbre um adenocarcinoma mamário expontâneo.

Tentativas visando esclarecer o mecanismo da ação carcinostática da uretana têm sido realizadas sem resultados satisfatórios (Bryan e col. 1949; Skipper, 1950).

A ineficácia da ureia (composto parcialmente semelhante a uretana), sôbre o desenvolvimento do Sarcoma 180 foi reportada por Stock (1955).

Como não encontramos referência na literatura sôbre o emprêgo do carbonato di-etílico em tumores experimen-

tais e como o mesmo apresenta uma parcial semelhança estrutural com a uretana , resolvemos verificar a ação do mesmo na evolução do Carcino-sarcoma de Walker 256.

MÉTODOS E RESULTADOS

20 ratos machos Sprague Dawley implantados na região escapular com fragmentos de 2 a 3 mm. de tamanho, de Carcino-sarcoma de Walker 256 foram separados em dois grupos de 10 animais:

1.° Grupo — Testemunha.

2.° Grupo — Recebeu por intubação gástrica de 24/24 horas carbonato di-etílico na dose de 5ml Kg. de pêso corporal durante 14 dias.

15 dias após o implante os tumores foram cuidadosamente dissecados e pesados, a comparação entre os pêsos dos dois grupos quer em conjunto ou isoladamente não demonstrando resultado significativo quanto a uma possível ação inibitória. Também não foi verificada perda de pêso apreciável no grupo de animais que recebeu a droga.

Notou-se durante o transcurso da experiência que os ratos que recebiam o carbonato di-etílico apresentavam-se intensamente sedados entre 1 e 7 horas após a administração do mesmo.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, analisados juntamente com a ineficácia da uréia no desenvolvimento do sarcoma 180 por Stock (1955) e ajuntados as conclusões de Skipper e Bryan (1949), de que a uretana "in-vivo" é degradada a CO_2, etanol e amónia (compostos que não apresentam atividade na evolução dos tumores experimentais) cremos confirmar ainda mais as conclusões a respeito da especificidade estrutural da uretana na justificação de seus efeitos carcinostáticos (Skipper e Bryan, 1949).

SUMMARY

The authors report negative results of Diethyl Carbonate on the evolution of Walker 256 carcinosarcoma implanted in Sprague Dawley rats when administered by gastric intubation in 5 ml. doses per (kilo) at 24-hour intervals.

Also are reported the low toxicity and intense sedative

actions presented by Diethyl carbonate following the mentioned procedures. Intensive sedative effect is complete in 30 or 60 minutes and last about 6 hours.

Some considerations about the structural specificity of Urethane molecule in order to obtain carcinostatic effects are presented.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verfasser berichten ueber die Unwirksamkeit des Diaethylcarbonates beim Karzino-Sarkom Walker 256 welches in Ratten der Rasse Sprague Dawley ueberimpft war; die Verabreichung betrug auf oralem Weg 5 ml/kg Lebendgewicht mit 24 stuendigen Zeitabschnitten.

Es wird auch ueber die niedrige Toxitaet genannten Produktes gesprochen wie auch die intensive Schlafwirkung von ungefaehr 6 Stunden Dauer behandelt wird und welcher Fall eine halbe Stunde bis zu einer Stunde nach der Verabreichung eintritt.

Abhandlungen welche die Spezifitaet der Struktur des Urethanmolekuels bei dem Erhalt von karzinostatischen Wirkungen besprechen, werden vorgelegt.

RESUMÉ

Les auteurs relatent l'inefficacité du Carbonate di-éthylique dans l'évolution du Carcino-sarcome de Walker 256, implanté sur dés rats Sprague Dawley, quand il est administré par voie orale à la dose de 5 ml/Kg de poids corporel, toutes les 24 heures.

Est également relatée la faible toxicité du composé cité ainsi que une intense action sédative d'une durée d'approximativement six heures et qui commence entre une demi heure et 1 heure après l'administration.

Ou présente des considérations au sujet de la spécificité structurale de la molécule à urétane pour l'obtention d'effects carcinostatiques.

REFERÊNCIAS

BRYAN, C. E., SKIPPER, H. E., and WHITE, L., JR. 1949. *J. Biol. Chem. 177*, 941-50.

HADDOW, A., and SEXTON, W. A. 1946. *Nature 157*, 500-03.

HENSHAW, P. S., and MEYER, H. L. 1944. *J. Natl. Cancer Inst. 4*, 523-25.

HENSHAW, P. S., and MEYER, H. L. 1945. *J. Natl. Cancer Inst. 5*, 415-17.

NETTLESHIP, A., HENSHAW, P. S., and MEYER, H. L. 1943. *J. Natl. Cancer Inst.* 4, 309-19.

SELBIE, F. R., and THACKRAY, A. C. 1948. *Brit. J. Cancer*, 2, 380-85.

SKIPPER, H. E. 1950. *Texas Repts. Biol. Med.* 4, 543-50.

SKIPPER, H. E., and BRYAN, C. E. 1949. *J. Natl. Cancer Inst.* 9, 391-97.

STOCK, C. C. et al. 1955. *Cancer Research Supp.* n.º 2, 239.

O **Instituto de Antibióticos** — órgão da Universidade do Recife — foi fundado pelo Conselho Universitário, em sessão de 8 de março de 1952 por proposta do Prof. Oswaldo Gonçalves de Lima então Diretor da Escola de Química.

Êste periódico é dirigido pelo **Instituto de Antibióticos** e publicado pela Imprensa da Universidade do Recife (Brasil), destinando-se especialmente à divulgação dos resultados das atividades científicas do mencionado Instituto.

Anteriormente à sua criação, a maioria de tais resultados vinha sendo publicada nos **Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco**.

Merecerá sempre a melhor acolhida tôda colaboração de interêsse científico e enquadrada em a natureza desta revista, oferecida por investigadores — nacionais ou estrangeiros — que desejem utilizá-la como veículo de divulgação de seus trabalhos no campo dos antibióticos.

Endereço:

Revista do Instituto de Antibióticos
Cidade Universitária
Recife — BRASIL

Comissão de Redação: Oswaldo Gonçalves de Lima
Bento Magalhães Neto
Maria Helena D. Maia
José Otamar Falcão de Moraes

Diretor do Instituto de Antibióticos:

Prof. Oswaldo Gonçalves de Lima

Reitor da Universidade do Recife:

Prof. João Alfredo Gonçalves da Costa Lima

Trabalhos anteriormente publicados pelo Instituto de Antibióticos:

N.º 1. (Revista de Química Industrial, N.º 249, Rio de Janeiro, 1953). Biflorina, novo antibiótico isolado da *Capraria biflora (Scrophulariaceae)*. Por Oswaldo Gonçalves de Lima, Ivan Leôncio d'Albuquerque, Paulo Loureiro, Carlos Larios Carmona & Mario Zapata Bènard.

N.º 2. (ANAIS da Sociedade de Biologia de Pernambuco, Tomo XI, N.º 1, Universidade do Recife, 1953). Novas observações sôbre a Biflorina — antibiótico isolado da *Capraria biflora L. (Scrophulariaceae)*. Por Oswaldo Gonçalves de Lima, Ivan Leôncio d'Albuquerque e Paulo Loureiro.

N.º 3. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XI, N.º 1, Univ. Recife, 1953). Estudo de um *Streptomyces sp.* (Cêpa K-7, do Instituto de Antibióticos) ativo contra *Mycobacterium spp.* e *Escherichia coli R.* Por Mário Zapata Bènard, Oswaldo Gonçalves de Lima, José

Otamar Falcão de Morais, Luiz de Albuquerque Araújo e Carlos Larios Carmona.

N.º 4. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XI, N.º 1, Univ. Recife, 1953). Isolamento e estudos preliminares de uma substância antibiótica produzida por um *Streptomyces sp.* (Cêpa K-7 do Inst. Antib. Univ. Recife). Por Oswaldo Gonçalves de Lima, José Otamar Falcão de Morais, Mário Zapata Bènard e Luiz de Albuquerque Araújo.

N.º 5. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XII, N.º 1, Univ. Recife, 1954). Estudo sumário de um *Streptomyces* (Cêpa 7K1 do Inst. de Antib. Univ. Recife). Por Oswaldo Gonçalves de Lima, Luiz de Albuquerque Araújo, José Otamar Falcão de Morais, Marisa Pinheiro Machado e Carlos Larios Carmona.

N.º 6. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XII, N.º 1, Univ. Recife, 1954). Estudo sôbre a Eurimicina, antibiótico produzido pelo *Streptomyces sp.* (Cêpa 7K1 do Inst. Antib. Univ. Recife). Por Oswaldo Gonçalves de Lima, Luiz de Albuquerque Araújo, José Otamar Falcão de Morais, Marisa Pinheiro Machado, Antônio Andrade e João Wanderley de Siqueira Neto.

N.º 7. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XII, N.º 1, Univ. Recife, 1954). Alamandina, novo antibiótico ativo contra protozoários, isolado de *Allamanda violacea (Apocynaceae)*. Por Oswaldo Gonçalves de Lima e José Moreira Caldas.

N.º 8. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XII, N.º 1, Univ. Recife, 1954). Selovicina, novo antibiótico isolado de *Croton sellowii* Baill. Por Oswaldo Gonçalves de Lima, Ivan Leôncio d'Albuquerque, Paulo Loureiro, Luiz de Albuquerque Araújo e Antônio Andrade.

N.º 9. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XII, N.º 1, Univ. Recife, 1954). Observações preliminares sôbre um antibiótico produzido por um *Streptomyces* (Cêpa A-24 do Inst. Antib. Univ. Recife). Por Oswaldo Gonçalves de Lima, Paulo Loureiro e José Otamar Falcão de Morais.

N.º 10. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XIII, N.º 1, Univ. Recife, 1955). Primeiras observações sôbre a ação antibacteriana de extratos de amêndoas de *Virola gardneri*. Por Oswaldo Gonçalves de Lima, I. L. d'Albuquerque, A. Andrade, M. Pinheiro Machado, J. O. Falcão de Morais, G. Pereira Pinto e P. Loureiro.

N.º 11. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XIII, N.º 1, Univ. Recife, 1955). Nova espécie do gênero *Acetobacter: A. lermae*, Por Oswaldo Gonçalves de Lima, J. O. Falcão de Morais e C. L. Carmona.

N.º 12. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XIII, N.º 1, Univ. Recife, 1955). Nova espécie do gênero *Nocardia: N. recifei*, sua atividade antagonista. Antibiótico produzido. Por Oswaldo Gonçalves de Lima, M. Pinheiro Machado, L. de Albuquerque Araújo, J. O. Falcão de Morais e H. Biermann.

N.º 13. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XIII, N.º 2, Univ. Recife, 1955). Primeiras observações sôbre um antibiótico do grupo da estreptomicina. Por Oswaldo Gonçalves de Lima, Marisa Pinheiro Machado, José Otamar Falcão de Morais, Hans Biermann, Evans Silva e Antônio Andrade.

N.º 14. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XIII, N.º 2, Univ. Recife, 1955). Breve nota sôbre a atividade antibiótica de amostras de raízes de *Aristolochia foetida*, após longo estágio em herbário. Por Oswaldo Gonçalves de Lima e Marisa Pinheiro Machado.

N.º 15. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XIII, N.º 2, Univ. Recife, 1955). Primeiras observações sôbre dois antibióticos de espectro, restrito, produzidos por *Streptomyces* sp. (Cêpa A116 IAUR). Por Oswaldo Gonçalves de Lima, Marisa Pinheiro Machado, Gerson Pereira Pinto, José Otamar Falcão de Morais e Hans Biermann.

N.º 16. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XIV, Ns. 1-2, Univ. Recife, 1956). Uma cêpa de *Streptomyces californieus* (Waksman e Curtis) Waksman e Henrici (1) produtora de um corante antibiótico, indicador ácido-básico. Por José Otamar Falcão de Morais, Oswaldo Gonçalves de Lima, Marisa Pinheiro Machado, Maria H. Dália Maia e Luiz de Albuquerque Araújo.

N.º 17. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XIV, Ns. 1-2, Univ. Recife, 1956). *Streptomyces* A20 (IAUR) — produtor de um antibiótico do grupo de estreptotricina — identificado como *S. cinnamonensis*. Por José Otamar Falcão Morais, Oswaldo Gonçalves de Lima e Maria H. Dália Maia.

N.º 18. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XIV, Ns. 1-2, Univ. Recife, 1956). O *Stroptomyces* produtor do antibiótico eurimicina — cêpa 7K1 do IAUR — identificado como *S. lavendulae*. Ligeiro estudo crítico sôbre algumas espécies do grupo do *S. lavendulae*. Por Oswaldo Gonçalves de Lima, José Otamar Falcão de Morais, Maria H. Dália Maia e Maria Glauce Maciel.

N.º 19. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XIV, Ns. 1-2, Univ. Recife, 1956). Primeiras observações sôbre a ação antimicrobiana do Lapachol. Por Oswaldo Gonçalves de Lima, Ivan Leôncio d'Albuquerque, Marisa Pinheiro Machado, Evans Silva e Gerson Pereira Pinto.

N.º 20. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XIV, Ns. 1-2, Univ. Recife, 1956). Uma nova substância antibiótica isolada do "Pau d'arco", *Tabebuia sp.* Oswaldo Gonçalves de Lima, Ivan Leôncio d'Albuquerque, Marisa Pinheiro Machado, Gerson Pereira Pinto e Maria Glauce Maciel.

N.º 21. (Rev. Inst. Antib. Univ. Recife, vol. 1, N. 1, 1958). Algumas observações sôbre a ação antifúngica de um *Streptomyces sp.* (Cêpa 233 — IAUR) — Oswaldo Gonçalves de Lima, Marisa Pinheiro Machado, Maria Glauce Maciel, Evans Silva, Maria Helena Dália Maia.

N.º 22. (Rev. Inst. Antib. Univ. Recife, Vol. 1, N. 1, 1958). Método

simples de extração e purificação da Biflorina — Oswaldo Gonçalves de Lima, Ivan Leôncio d'Albuquerque.

N.º 23. (Rev. Inst. Antib. Univ. Recife, Vol. 1, N. 1, 1958). Estudo sôbre a nutrição de *Hemispora stellata (Sporendonema epizoum)* — Orio Ciferri e Luiz de Albuquerque Araújo.

N.º 24. (Rev. Inst. Antib. Univ. Recife, Vol. 1, N. 1, 1958). Substâncias antimicrobianas na Canafístula *(Cassia excelsa* Schrad) I. Cassilisina, um novo alcalóide com ação antibiótica — Oswaldo Gonçalves de Lima, Ivan Leôncio d'Albuquerque, Marisa Pinheiro Machado, Gerson Pereira Pinto.

N.º 25. (Rev. Inst. Antib. Univ. Recife, Vol. 1, N. 1, 1958). Substâncias antimicrobianas na Canafístula *(Cassia excelsa* Schrad) II. Cassilisidina, um antibiótico de ação bacteriolítica — Orio Ciferri, Marisa Pinheiro Machado, Luiz de Albuquerque Araújo.

N.º 26. (Rev. Inst. Antib Univ. Recife, Vol. 1, N. 1, 1958). Produzione de Pigmenti Flavinici da parte di un Attinomicete — Oto Ciferri, Marisa Pinheiro Machado.

N.º 27. (Rev. Inst. Antib. Univ. Recife, Vol. 1, N. 1, 1958). *Streptomyces* de amplio espectro antimicrobiano, aislados de suelos de Brasil — A. Sanchez-Marroquim.

N.º 28. (Rev. Inst. Antib. Univ. Recife, Vol. 1, N.º 2, 1958). Um estudo taxonômico em tôrno de Streptomyces lavendulae. *S. lavendulae var. brasilicus nov. var.* José Otamar Falcão de Morais, Maria Emília Souto Maior Genn.

N.º 29. (Rev. Inst. Antib. Univ. Recife, Vol. 1, N.º 2, 1958). Sôbre um antibiótico de espectro restrito produzido por um *Streptomyces* (Cultura n.º 721). Marisa Machado Albuquerque, Oswaldo Gonçalves de Lima, Maria Célia Pinto Navarro, Francisco Décio de Andrade Lyra, Evans Silva.

N.º 30. (Rev. Inst. Antib. Univ. Recife, Vol. 1, N.º 2, 1958). Breve nota sôbre a atividade antimicrobiana da biflorina purificada por partição Craig Oswaldo Gonçalves de Lima, Ivan Leôncio d'Albuquerque, Bento Magalhães Neto, Marisa Machado de Albuquerque.

N.º 31. (Rev. Inst. Antib. Univ. Recife, Vol. 1, N.º 2, 1958). Sôbre uma variedade de Streptomyces comum nos solos do Brasil: *Streptomyces venezuelae var. roseospori nov. var.* José Otamar Falcão de Morais, Maria Helena Dália Maia, Maria Emília Souot Maior Genn.

N.º 32. Rev. Inst. Antib. Univ. Recife, Vol. 1, N.º 2, 1958). Sôbre uma interessante e pouco conhecida publicação de Paul Lindner acêrca do emprêgo *Terapêutico de Zymomonas mobilis* Kluyver e Van Niel, 1936 (Pseudomonas lindneri). Oswaldo Gonçalves de Lima.

N.º 33. Rev. Inst. Antib. Univ. Recife, Vol. 1, N.º 2, 1948). Primeiras observações sôbre um antibiótico com propriedades de indicador ácido-básico isolado de *Cnidoscolus urens — Euphorbiaceae —*

Evans Silva, Oswaldo Gonçalves de Lima, Marisa Machado de Albuquerque.

N.º 34. Rev. Inst. Antib. Univ. Recife, Vol. 1, N.º 2, 1958). Da ação da glucurolactona e do glucuronato de sódio no desenvolvimento do carcinosarcoma de Walker 256 — Nota prévia — Evans Silva, Karline Pinto, Ednaldo Fontes.